

ЗМІСТ *** CONTENT
*** БІОХІМІЯ *** BIOCHEMISTRY ***

Слівінська О.М., Сеньків О.М., Іскра Р.Я. Антиоксидантна система у скелетних м'язах та крові щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку.....	5
Шевченко Н.С., Лебець І.С., Кашкалда Д.А. Зміни біохімічних показників сполучної тканини у дітей і підлітків при запальних захворюваннях суглобів.....	11

*** БОТАНІКА ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН *** BOTANY AND PLANT ECOLOGY ***

Авєкін Я.В., Нужина Н.В., Гайдаржи М.М. Структура насінин сукулентних представників родини Аросупасеае.....	16
Коваленко І.М. Ценопопуляції клоноутворюючих чагарничкових рослин лісових угруповань Національного природного парку «Деснянсько-Старогутський»	29
Мельниченко Г.М. Особливості перебігу палінації представників роду <i>Betula</i> L. у Івано-Франківську впродовж 2013–2015 років	38

*** ГЕНЕТИКА *** GENETICS ***

(спеціальний розділ «*Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології*»
(special section “*Drosophila in the experimental genetics and biology*”))

Березовський В.Я., Чака О.Г., Плотнікова Л.М., Левашов М.І., Літовка І.Г., Янко Р.В. Стійкість до стресу дрозофіл, адаптованих до умов гіпоксії.....	45
Вітушинська М.В., Матійців Н.П., Черник Я.І. Нейродегенеративні зміни та рухова активність у <i>Drosophila melanogaster</i> у разі тканинно-специфічної експресії гена <i>Sod1</i> в гліоцитах.....	54
Гора Н.В., Костенко Н.Д., Майстренко О.М., Серга С.В., Козерецька І.А. Відсутність кореляційного зв'язку між рівнем радіоактивного забруднення та інфікованістю <i>Wolbachia</i> в природних популяціях <i>Drosophila melanogaster</i> України	60
Дика Л.Д., Страшнюк В.Ю., Шкорбатов Ю.Г. Компоненти пристосованості у <i>Drosophila melanogaster</i> за впливу мікрохвильового опромінювання.....	65
Скоробагатько Д.А., Страшнюк В.Ю., Мазилів А.А. Продолжительність життя в потомстві <i>Drosophila melanogaster</i> після острого γ -облучення.....	74
Щербакова О.В., Боднар Л.С., Горбулінська С.М., Черник Я.І. Характеристика фенотипових змін та генетичний аналіз нейродегенеративної мутації 3.5.8 <i>Drosophila melanogaster</i>	85

*** ГЕНЕТИКА *** GENETICS ***

Атраментова Л.А., Мустафаєва Л.А. Индексы потенциального отбора в популяции крымских татар.....	91
Volkova N.Ye., Filiponenko N.S., Vorobyova L.I. Variability of <i>Drosophila melanogaster</i> radius incompletus trait expressivity under the food fortification by folate-methionine cycle metabolites	97
Горенская О.В., Шкорбатов Ю.Г., Гаврилов А.Б. Особенности адаптивного ответа на кратковременное воздействие крайневысокочастотного облучения линий <i>Drosophila melanogaster</i> , несущих мутацию <i>black</i>	108
Колот Н.В., Костенко В.В., Воробьева Л.И. Влияние возраста родителей и аллельного состояния гена <i>white</i> на показатели приспособленности <i>Drosophila melanogaster</i>	117

*** ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ *** ZOOLOGY AND ECOLOGY ***

Варигин А.Ю. Половая структура популяции и цикл размножения <i>Lekanesphaera monodi</i> (Arcangeli, 1934) (Crustacea, Isopoda) в сообществе обрастания Одесского залива Черного моря	125
Токарский В.А. История изучения популяции красного сурка (<i>Marmota caudata</i> Geoff., 1842) в западной части Таласского Алатау	130
Шакаралиева Е.В. Биоразнообразие трематод рыб трансграничного озера Джандар, Азербайджан	141
Шупова Т.В., Чаплыгина А.Б. Орнитофауна заказника общегосударственного значения «Лучковский»	148

*** КРИБІОЛОГІЯ *** CRYOBIOLOGY ***

Макашова О.Є., Бабійчук Л.О., Зубова О.Л., Зубов П.М. Вплив різних концентрацій кріопротектора ДМСО на збереженість, життєздатність та вміст активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові при кріоконсервуванні	157
---	-----

*** ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН *** PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ***

Пахомов О.В. Вживаність сім'яників новонароджених мишей при їх алотрансплантації дорослим тваринам під ниркову капсулу чи всередину сім'яника	165
Семионова Е.А., Нипот Е.Е., Орлова Н.В., Шпакова Н.М. Гематокрит как критерий оценки реакции эритроцитов на изменение осмоляльности среды	173
Ткаченко А.С., Корниенко Е.М., Посохов Е.А. Апоптоз энтероцитов при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите: исследование методом флуоресцентных зондов	179
Шевчук Т.Я., Романюк А.П. Особливості вегетативної регуляції серця в спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів	187

*** КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ *** BRIEF COMMUNICATIONS ***

Barannik T.V., Fedorova A.O. <i>In silico</i> analysis of heme binding effect on the formation of mouse arginyl-tRNA-protein transferase 1 and protein LIAT1 complex	194
---	-----

*** ІНФОРМАЦІЯ *** INFORMATION ***

Правила для авторів	199
----------------------------------	-----

••• БІОХІМІЯ ••• BIOCHEMISTRY •••

УДК: 678.048:591.175

Антиоксидантна система у скелетних м'язах та крові щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку О.М.Слівінська, О.М.Сеньків, Р.Я.Іскра

*Інститут біології тварин НААН (Львів, Україна)
e-mail: rudasliva@ukr.net*

У статті наведені дані про вплив цитрату цинку на показники антиоксидантної системи у скелетних м'язах та крові щурів за експериментального цукрового діабету (ЕЦД). За умов ЕЦД було виявлено зниження активності ферментів антиоксидантного захисту та зростання вмісту гідропероксидів ліпідів у скелетних м'язах і крові, а також збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у скелетних м'язах щурів відносно тварин контрольної групи. За умов додавання до раціону щурів із ЕЦД цитрату цинку в дозі 20 і 50 мг Zn/кг маси тіла спостерігалось зростання активності досліджуваних ферментів і зниження вмісту гідропероксидів ліпідів у скелетних м'язах і крові та підвищення рівня відновленого глутатіону в еритроцитах, що може свідчити про активацію антиоксидантних процесів за дії цитрату цинку та нормалізацію фізіологічно-біохімічного стану організму щурів.

Ключові слова: щури, цитрат цинку, гіперглікемія, антиоксидантна система.

Антиоксидантная система в скелетных мышцах и крови крыс при гипергликемии и действии цитрата цинка О.М.Сливинская, О.М.Сеньків, Р.Я.Іскра

В статье приведены данные о влиянии цитрата цинка на показатели антиоксидантной системы в скелетных мышцах и крови крыс при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД). В условиях ЭСД было обнаружено снижение активности ферментов антиоксидантной защиты и рост содержания гидропероксидов липидов в скелетных мышцах и крови крыс, а также повышение содержания ТБК-активных продуктов в скелетных мышцах крыс в сравнении с животными контрольной группы. При добавлении в рацион крыс с ЭСД цитрата цинка в дозе 20 и 50 мг Zn/кг массы тела наблюдался рост активности исследуемых ферментов и снижение содержания гидропероксидов липидов в скелетных мышцах и крови, а также повышение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах, что может свидетельствовать об активации антиоксидантных процессов при воздействии цитрата цинка и нормализации физиологического-биохимического состояния организма крыс.

Ключевые слова: крысы, цитрат цинка, гипергликемия, антиоксидантная система.

Antioxidant system in rats' skeletal muscles and blood at hyperglycemia and the influence of zinc citrate O.M.Slivinska, O.M.Senkiv, R.Ya.Iskra

Data about the influence of zinc citrate on indices of the antioxidant system in rats' skeletal muscles and blood at experimental diabetes mellitus (EDM) are presented in the article. The decreased activity of antioxidant defense system enzymes and increased lipid hydroperoxides content in rats' skeletal muscles and blood and MDA content in rats' skeletal muscles at EDM were established, compared to the rats of the control group. At zinc citrate addition in doses of 20 and 50 mg Zn/kg of body weight to the diet of rats with experimentally induced diabetes we observed increased activity of investigated enzymes and decreased lipid hydroperoxides content in skeletal muscles and blood, and increase of reduced glutathione content in erythrocytes, which may indicate the activation of antioxidant processes and normalization of the physiological and biochemical state of rats' organism under the action of zinc citrate.

Key words: rats, zinc citrate, hyperglycemia, antioxidant system.

Вступ

Цинк відіграє важливу роль у метаболізмі глюкози, сприяє її утилізації м'язовими і жировими клітинами (Isbir et al., 1994). Цей мікроелемент, на відміну від Феруму і Купруму, не має оксидантних властивостей, що покращує його надходження та засвоєння клітинами (Prasad, 2009). Цинк є структурним компонентом ключових антиоксидантних ензимів, таких як супероксиддисмутаза, тому дефіцит елемента знижує їх синтез, що призводить до збільшення оксидативного стресу (Kelly, 1998). Встановлено що Цинк відіграє важливу роль при синтезі, накопиченні і вивільненні інсуліну в Langerhans-клітинах підшлункової залози. Він залучений у регуляцію механізму передачі сигналу через рецептори інсуліну, а також ініціює синтез інсулінових рецепторів (Tang, Shay, 2001). Зважаючи на прогнозований ріст захворюваності на цукровий діабет та високу розповсюдженість і смертність від серцево-судинної патології, цікавим є факт, що дефіцит Цинку розглядається як потенційний фактор ризику розвитку цих станів (Chasapis et al., 2012; Little et al., 2010). Тому метою наших досліджень було з'ясувати вплив різних доз Цинку на показники прооксидантно-антиоксидантної системи в скелетних м'язах і крові щурів з експериментально індукованим діабетом.

Об'єкт та методи дослідження

Дослідження проведені на 28 білих лабораторних щурах, які перебували в умовах віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 150 до 170 г, та були розділені на чотири групи: I група – контрольна, II, III і IV – дослідні. У тварин усіх дослідних груп на тлі 24-годинного голодування був викликаний експериментальний цукровий діабет (ЕЦД) шляхом внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину ("Sigma", США) з розрахунку 45 мг/кг маси тіла. Гіперглікемію виявляли шляхом вимірювання глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра ("Gamma-M"). Тваринам III і IV груп протягом місяця до основного раціону додавали розчин цитрату цинку в дозах 20 і 50 мг Zn/кг маси тіла.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

На 30 добу тварин виводили з експерименту під легким ефірним наркозом. Матеріалом для дослідження були гомогенати скелетних м'язів і кров щурів. У плазмі крові визначали рівень глюкози глюкозооксидазним методом, за допомогою стандартного набору, виготовленого фірмою "LACHEMA" (Чехія), вміст гідропероксидів – за методом, принцип якого полягає в осадженні протеїну трихлороцтовою кислотою з наступним внесенням у середовище тіоціанату амонію (Миرونчик, 1982), концентрацію ТБК-активних продуктів – за допомогою кольорової реакції малонового діальдегіду з тіобарбітуровою кислотою (Коробейникова, 1989). Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.1.15.1.) визначали за методом, принцип якого полягає у відновленні нітротетразолію супероксидними радикалами (Дубинина и др., 1983). Активність глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону (Моин, 1986). Активність каталази (КТ, КФ 1.11.1.6) визначали за допомогою здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий кольоровий комплекс (Корольюк и др., 1988). Активність глутатіонредуктази (ГР, КФ 1.6.4.2) визначали за швидкістю відновлення глутатіону в присутності NADPH (Влізло та ін., 2004). Вміст відновленого глутатіону визначали за рівнем утворення тіонітрофенільного аніону в результаті взаємодії SH-груп глутатіону з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (Влізло та ін., 2004). Одержані цифрові дані обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми «Statistika». Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Стьюдента.

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що у щурів II групи з ЕЦД порівняно з тваринами контрольної групи рівень глюкози в плазмі крові вірогідно зростав у три рази (з $3,56 \pm 0,16$ до $11,01 \pm 0,37$ ммоль/л). У щурів III і IV груп, яким на тлі ЕЦД до основного раціону додавали розчин цитрату цинку, в кількостях 20 і 50 мг Zn/кг м.т., також спостерігалось вірогідне підвищення рівня глюкози у плазмі крові відповідно у 2,7 ($11,44 \pm 0,35$ ммоль/л) і 2 ($9,87 \pm 0,25$ ммоль/л) рази у порівнянні з рівнем даного показника у тварин I групи. Однак у щурів IV групи спостерігалось вірогідне зниження рівня глюкози в крові на 14% порівняно з тваринами II групи, що може бути зумовлене дією Цинку на посилення секреції інсуліну, для якого характерна гіпоглікемічна дія.

Відомо, що на фоні гіперглікемії активується низка метаболічних шляхів перетворення глюкози, внаслідок чого відбувається надмірне утворення активних форм Оксигену, насамперед супероксид-аніона (O_2^*), який, взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на високореакційноздатний гідроксил-радикал (HO^*), синглетний кисень (O_2^1), пероксид гідрогену (H_2O_2) та пероксинітрит ($ONOO^-$) (Lee et al., 2003). Значна роль в антиоксидантному захисті клітин відводиться супероксиддисмутази, яка, дисмутуючи супероксидний аніон-радикал (O_2^*), перетворює його в менш реакційноспроможний пероксид гідрогену. СОД безпосередньо забезпечує обрив вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів на так званій «нульовій» стадії вільнорадикального окиснення (Стефанов и др., 2004). Відомо, що активність антиоксидантних ензимів за умов хронічної гіперглікемії може знижуватися внаслідок їх неензиматичного глікозилювання (Стефанов и др., 2004). Дані досліджень СОД свідчать про вірогідне зниження її активності в еритроцитах і тканинах скелетних м'язів щурів II групи за ЕЦД стосовно I групи на 9 і 19% (табл. 1). Подібне зниження активності ензиму спостерігалось і в тканинах скелетних м'язів тварин III групи, у порівнянні з показниками тварин I (на 34%) та II (на 19%) груп.

Таблиця 1.
Активність супероксиддисмутази в лізатах еритроцитів та гомогенатах скелетних м'язів щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку, ум.од/мг білка ($M \pm m$; n=7)

	I група	II група	III група	IV група
Еритроцити	26,53±0,509	22,74±0,715****	25,17±0,431#	25,17±0,42##
Скелетні м'язи	63,43±1,05	51,67±0,853***	41,67±0,579****###	65,68±0,876####

*Примітка: в цій та наступних таблицях позначено * статистично вірогідні різниці між тваринами дослідних груп і тваринами I (контрольної) групи: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; # – позначені статистично вірогідні різниці між тваринами III і IV дослідних груп і тваринами II групи: # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$.*

У той же час спостерігалось вірогідне зростання активності СОД в еритроцитах тварин III і IV груп на 11% та тканинах скелетних м'язів тварин IV групи на 27% відносно тварин II групи. Це можна пояснити тим, що СОД – ензим, який у своєму складі містить Цинк, тому за додаткового впоювання цитрату цинку, особливо в кількості 50 мг Zn/кг м.т., було відмічено нівелювання зниженої активності ензиму за ЕЦД та досягнення його рівня до контрольних значень.

При дослідженні активності каталази не було виявлено вірогідних змін активності ензиму в еритроцитах тварин II і III груп стосовно контрольної. У той час як у IV групі було встановлено вірогідне підвищення активності ензиму на 15% відносно I групи та на 11% відносно II групи (табл. 2). У скелетних м'язах тварин II, III і IV груп спостерігалось вірогідне зниження активності каталази, відповідно на 39%, 39% і 23%, у порівнянні з показниками активності ензиму у тварин I групи. Однак відносно II групи тварин з ЕЦД в скелетних м'язах тварин IV групи було встановлено вірогідне підвищення активності ензиму на 27% (табл. 2).

Таблиця 2.
Активність каталази в лізатах еритроцитів та гомогенатах скелетних м'язів щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку, ммоль/хв·мг протеїну ($M \pm m$; n=7)

	I група	II група	III група	IV група
Еритроцити	18,38±0,373	18,945±1,4	18,51±0,534	21,146±0,864****###
Скелетні м'язи	18,78±0,972	11,35±0,319***	11,48±0,718***	14,48±0,83****###

Функціонування різних компонентів АОС тісно пов'язане з окремими ланками клітинного метаболізму. Насамперед це стосується активності глутатіонпероксидази, ключового ензиму АОС, активність якого вірогідно змінювалася у всіх дослідних групах, як в еритроцитах тварин, так і в тканинах скелетних м'язів (табл. 3). У тварин II дослідної групи спостерігалось вірогідне зниження даного ензиму відносно контролю (I групи) на 28,1% в еритроцитах і на 49,9% у скелетних м'язах. В той час як в еритроцитах тварин IV дослідної групи активність досліджуваного ензиму була вірогідно

вищою на 24,5%, а в скелетних м'язах щурів III та IV дослідних груп – нижчою, відповідно на 34,9 і 39,7%, відносно щурів контрольної групи. Відносно тварин II групи в еритроцитах тварин III і IV груп активність ензиму була вірогідно вищою на 46 і 73%, а в скелетних м'язах – на 30 і 20%.

Таблиця 3.

Активність ензимів глутатіонової системи та вмісту відновленого глутатіону в лізатах еритроцитів та гомогенатах скелетних м'язів щурів при гіперглікемії та дії цитрату цинку ($M \pm m$; $n=7$)

	I група	II група	III група	IV група
Активність глутатіонпероксидази, мкмоль/хв.мг протеїну				
Еритроцити	23,05±0,696	16,56±0,366***	24,22±1,18###	28,70±0,322***###
Скелетні м'язи	37,3±2,6	18,68±0,989***	24,27±2,38**	22,46±0,718***###
Активність глутатіонредуктази, мкмоль/хв.мг протеїну				
Еритроцити	1,36±0,132	1,25±0,131	1,52±0,095	1,133±0,148
Скелетні м'язи	0,47±0,045	0,207±0,008***	0,57±0,045###	0,59±0,017***###
Вміст відновленого глутатіону, мкмоль/мл (г тканини)				
Еритроцити	0,73±0,027	0,62±0,066	0,97±0,055#	0,77±0,065
Скелетні м'язи	0,33±0,015	0,257±0,031	0,32±0,038	0,32±0,021

При дослідженні активності ГР в еритроцитах щурів усіх дослідних груп не було відмічено вірогідних змін в активності даного ензиму. У тканинах скелетних м'язів було відмічено вірогідне зниження активності ензиму в II дослідній групі на 127% відносно контрольної групи. Проте в III та IV дослідних групах відмічалось зростання активності ГР відповідно на 175% і 185% відносно тварин II дослідної групи.

Проведені нами дослідження показали, що активність ензимів глутатіонової системи в еритроцитах і скелетних м'язах щурів певною мірою залежить від рівня Цинку в їхньому раціоні, що очевидно збільшує синтез їх ензимних молекул.

Відновлений глутатіон є основним компонентом глутатіонової системи антиоксидантного захисту в організмі тварин. Глутатіон у клітині знаходиться в окисненій та відновленій формах, відношення між якими залежить, в основному, від активності глутатіонредуктази (Антоняк та ін., 2000; Бучко, 2004; Гулий та ін., 1995). При дослідженні вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах і скелетних м'язах щурів II-ї діабетичної групи нами не було виявлено вірогідних змін. Однак у дослідженнях інших авторів встановлено зменшення вмісту відновленого глутатіону за умов стрептозотоцинового діабету (Krebs, 2000), що може бути зумовлене посиленням його використання, зменшенням швидкості відновлення, а також порушеннями в процесі його біосинтезу. В еритроцитах при діабеті відновлений глутатіон інтенсивно використовується на підтримку нативного стану протеїнів, а також у процесах видалення пероксиду водню і гідропероксидів органічних речовин в умовах оксидативного стресу. Водночас швидкість його регенерації обмежена, оскільки відновні еквіваленти НАДН/НАДФН системи спрямовані на процеси відновлення тривалентного (фері-іона) феруму метгемоглобіну до двовалентного (феро-іона) (Кулинский, Колісниченко, 1990).

У дослідженнях нами не встановлено також вірогідних змін вмісту відновленого глутатіону в інших групах тварин, лише в еритроцитах щурів III групи виявлено вірогідне зростання його вмісту на 56% відносно II-ї діабетичної групи, що, очевидно, свідчить про певний зв'язок між цим компонентом глутатіонової системи в організмі та Цинком.

Антиоксидантна система (АОС) спрямована на регуляцію інтенсивності процесів ПОЛ і захист від руйнівної дії продуктів ліпопероксидації. ПОЛ та АОС добре збалансовані і працюють за принципом зворотного зв'язку: збільшення рівня антиоксидантів призводить до гальмування вільнорадикального окиснення, а це, у свою чергу, змінює властивості самих ліпідів: у них з'являються легкоокисні фракції, що прискорює процес ПОЛ. При цьому витрачається багато ендогенних антиоксидантів, і система повертається до вихідного рівня. Така динамічна рівновага ПОЛ та АОС у біологічних мембранах і рідинах притаманна всім рівням організації живих систем і є одним із основних показників нормального гомеостазу.

При дослідженні рівня гідропероксидів ліпідів було виявлено вірогідне зростання їх вмісту у плазмі крові тварин II дослідної групи на 91% та скелетних м'язах на 213% порівняно з контрольною

групою. Це, можливо, пов'язано з активацією процесів ліпопероксидації за умов гіперглікемії. Проте при порівнянні рівня гідропероксидів ліпідів у тварин III і IV дослідних груп відносно II групи було відмічено вірогідне зниження їх вмісту у плазмі крові, відповідно на 37 і 46,7%, та скелетних м'язах на 48% в обох групах (табл. 4).

Таблиця 4.

Вміст продуктів ПОЛ в плазмі крові та гомогенатах скелетних м'язів щурів

Гідропероксидація ліпідів в плазмі, ОЕ/мл (г тканини)				
	I група	II група	III група	IV група
Плазма крові	0,522±0,0168	0,996±0,134**	0,627±0,061#	0,53±0,024##
Скелетні м'язи	0,15±0,0052	0,47±0,0475***	0,245±0,0453##	0,245±0,0192***###
ТБК-активні продукти, нмоль/мл (г тканини)				
	I група	II група	III група	IV група
Плазма крові	3,84±0,106	3,94±0,136	3,9±0,0955	3,6±0,105
Скелетні м'язи	1,49±0,08	2,09±0,138**	2,38±0,183***	1,84±0,061**

Високий вміст ПОЛ і низька активність ферментів антиоксидантного захисту за ЕЦД, очевидно, пов'язані із зниженою секрецією інсуліну, що призводить до посилення дії його антагоніста – кортизолу, який посилює процеси пероксидації ліпідів і пригнічує функціонування системи антиоксидантного захисту.

При визначенні рівня ТБК-активних продуктів у плазмі крові тварин усіх дослідних груп не було відмічено вірогідних змін, в той час як у скелетних м'язах тварин II, III і IV груп спостерігалось вірогідне зростання їх вмісту відносно контролю на 40%, 59% та 23% відповідно. Даний факт вказує на стимулюючий вплив гіперглікемії на синтез вторинних продуктів ПОЛ в організмі щурів.

Таким чином, встановлено, що за умов ЕЦД спостерігається зниження активності ферментів антиоксидантного захисту, зростання вмісту гідропероксидів ліпідів у скелетних м'язах і крові та збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у скелетних м'язах щурів відносно тварин контрольної групи. Введення до раціону щурів з ЕЦД цитрату цинку, в кількостях 20 і 50 мг Zn/кг маси тіла, призводило до зростання активності досліджуваних ферментів, зниження вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів – гідропероксидів у скелетних м'язах і крові та підвищення рівня відновленого глутатіону в еритроцитах, що може свідчити про нормалізацію прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в організмі за дії органічної сполуки цинку.

Список літератури

- Антоняк Г.Л., Бабич Н.О., Сологуб Л.І., Снітинський В.В. Утворення активних форм кисню та система антиоксидантного захисту в організмі тварин // Біологія тварин. – 2000. – Т.2 (2). – С. 34–43. /Antonyak G.L., Babych N.O., Sologub L.I., Snityns'kyi V.V. Utvorennia aktyvnykh form kysnyu ta systema antyoksydantnoho zakhystu v organizmi tvaryn // Biologiya tvaryn. – 2000. – Т.2 (2). – С. 34–43./
- Бучко О.М. Зміни інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і активності антиоксидантних ферментів в окремих органах і тканинах тварин протягом онтогенезу // Біологія тварин. – 2004. – Т.6, № 1–2. – С. 11–18. /Buchko O.M. Zminy intensyvnosti perekysnoho okysnennya lipidiv i aktyvnosti antyoksydantnykh fermentiv v okremykh organakh i tkanyakh tvaryn protyagom ontogenezu // Biologiya tvaryn. – 2004. – Т.6, № 1–2. – С. 11–18./
- Влізло В.В., Федорук Р.С., Макар І.А. та ін. Довідник: Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. – Львів: Видавництво «ВМС», 2004. – 399с. /Mizlo V.V., Fedoruk R.S., Makar I.A. ta in. Dovidnyk: Fiziologo-biokhimichni metody doslidzhen' u biologii, tvarynnystvii ta veterynarniy medytsyni. – L'viv: Vydavnytstvo «VMS», 2004. – 399s./
- Гулий М.Ф., Мельничук Д.О. Про деякі проблеми біохімії // Укр. біохім. ж. – 1995. – Т.67, №3. – С. 76–84. /Gulyi M.F., Mel'nichuk D.O. Pro deyaki problemy biokhimii // Ukr. biokhim. zh. – 1995. – Т.67, №3. – С. 76–84./
- Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. – 1983. – №10. – С. 30–33. /Dubinina Ye.Ye., Sal'nikova L.A., Yefimova L.F. Aktivnost' i izofermentnyy spektr superoksiddismutazy eritrotsitov i plazmy krovi cheloveka // Lab. delo. – 1983. – №10. – С. 30–33./
- Коробейникова Э.Н. Модификация определения ПОЛ в реакции с ТБК // Лаб. дело. – 1989. – №7. – С. 8–10. /Korobeynikova Ye.N. Modifikatsiya opredeleniya POL v reaktsii s TBK // Lab. delo. – 1989. – №7. – С. 8–10./

- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18. /Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.Ye. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy // Lab. delo. – 1988. – № 1. – S. 16–18./
- Кулинский В.И., Колисниченко Л.С. Обмен глутатиона // Успехи биол. химии. – 1990. – Т.31. – С. 157–179. /Kulinskiy V.I., Kolisnichenko L.S. Obmen glutationa // Uspekhi biol. khimii. – 1990. – T.31. – S. 157–179./
- Мирончик В.В. Способ определения гидроперекисей липидов в биологических тканях. А.с. №1084681. СССР, МКИ G № 33/48. №3468369/2813. Заявл. 08.07.82. Оpubл. 07.04.84. Бюл. №13. /Mironchik V.V. Sposob opredeleniya gidroperekisey lipidov v biologicheskikh tkanyakh. A.s. №1084681. SSSR, MKI G № 33/48. №3468369/2813. Zayavl. 08.07.82. Opubl. 07.04.84. Byul. №13./
- Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – №12. – С. 724–727. /Moin V.M. Prostoy i spetsificheskyy metod opredeleniya aktivnosti glutatyonperoksidazy v eritrotsitakh // Lab. delo. – 1986. – №12. – S. 724–727./
- Стефанов А.В., Деримедведь Л.В., Чурилова И.В. и др. Клинико-экспериментальное обоснование применения препаратов супероксиддисмутазы в медицине. – Харьков: Изд-во НФаУ «Золотые страницы», 2004. – 288с. /Stefanov A.V., Derimedved' L.V., Churilova I.V. i dr. Kliniko-eksperimental'noye obosnovaniye primeneniya preparatov superoksiddismutazy v meditsine. – Khar'kov: Izd-vo NFAU «Zolotyie stranitsy», 2004. – 288s./
- Chasapis C.T., Loutsidou A.C., Spiliopoulou C.A. et al. Zinc and human health: an update // Arch. Toxicol. – 2012. – Vol.86, no.4. – P. 521–534.
- Isbir T., Tamer L., Taylor A., Isbir M. Zinc, copper and magnesium status in insulin-dependent diabetes // Diabetes Research. – 1994. – Vol.26, no.1. – P. 41–45.
- Kelly F. Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease // Journal of the International Federation of Clinical Chemistry. – 1998. – Vol.10, no.1. – P. 21–23.
- Krebs N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract // J. Nutr. – 2000. – Vol.130. – P. 1374–1377.
- Lee H.B., Ha H., King G.L. Reactive oxygen species and diabetic nephropathy // J. Am. Soc. Nephrol. – 2003. – Vol.14 (3). – P. 209–210.
- Little P.J., Bhattacharya R., Moreyra A.E., Korichneva I.L. Zinc and cardiovascular disease // Nutrition. – 2010. – Vol.26. – P. 1050–1057.
- Prasad A.S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2009. – Vol.12, no.6. – P. 646–652.
- Tang X., Shay N.F. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes // Journal of Nutrition. – 2001. – Vol.131, no.5. – P. 1414–1420.

Представлено: Р.С.Федорук / Presented by: R.S.Fedoruk

Рецензент: І.В.Нікітченко / Reviewer: I.V.Nikitchenko

Подано до редакції / Received: 16.02.2016

УДК: 616.72-053.2/.5:612.75

Зміни біохімічних показників сполучної тканини у дітей і підлітків при запальних захворюваннях суглобів Н.С.Шевченко, І.С.Лебець, Д.А.Кашкалда

*ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України» (Харків, Україна)
nshvchenko_kh@mail.ru*

У дітей і підлітків із запальними захворюваннями суглобів вивчено біохімічні параметри обміну сполучної тканини. Встановлено, що невід'ємною особливістю стану сполучної тканини при ревматоїдному і реактивних артритах у дітей і підлітків є метаболічні зміни її структур, що супроводжуються прогресуючою втратою основних функціонально значущих компонентів екстрацелюлярного матриксу, але з більш вираженою патологічною складовою при ювенільному ревматоїдному артриті. Основним віддзеркаленням розвитку дистрофічних змін залишається дефіцитний стан глікозаміногліканів (ГАГ), переважно за рахунок ГАГ₂ (хондроїтин-4-сульфати і дерматансульфати) і ГАГ₃ (дерматан- і кератансульфати). Виявлено гендерні відмінності, які свідчать про більшу інтенсивність обміну сполучної тканини у осіб жіночої статі.

Ключові слова: діти, підлітки, ювенільний ревматоїдний артрит, реактивний артрит, глікозаміноглікани, оксипролін, колагеназа.

Изменения биохимических показателей соединительной ткани у детей и подростков при воспалительных заболеваниях суставов Н.С.Шевченко, И.С.Лебев, Д.А.Кашкалда

У детей и подростков с воспалительными заболеваниями суставов изучены биохимические параметры обмена соединительной ткани. Установлено, что неотъемлемой особенностью состояния соединительной ткани при ревматоидном и реактивных артритах у детей и подростков являются метаболические изменения ее структур, сопровождающиеся прогрессирующей потерей основных функционально значимых компонентов экстрацеллюлярного матрикса, но с более выраженной патологической составляющей при ювенильном ревматоидном артриті. Основным отражением развития дистрофических изменений остается дефицитное состояние гликозаминогликанов (ГАГ), преимущественно за счет ГАГ₂ (хондроитин-4-сульфаты и дерматансульфаты) и ГАГ₃ (дерматан- и кератансульфаты). Обнаружены гендерные отличия, свидетельствующие о большей интенсивности обмена соединительной ткани у лиц женского пола.

Ключевые слова: дети, подростки, ювенильный ревматоидный артрит, реактивный артрит, гликозаминогликаны, оксипролин, коллагеназа.

Changes of connective tissue biochemical indexes in children and adolescents with inflammatory diseases of joints N.S.Shevchenko, I.S.Lebec, D.A.Kashkalda

The biochemical parameters of connective tissue metabolism in children and adolescents with inflammatory diseases of joints have been studied. It has been shown that an essential feature of the state of connective tissue at rheumatoid and reactive arthritis in children and adolescents are metabolic changes of its structures, accompanied by a progressive loss of basic functionally important components of the extracellular matrix, but with a more pronounced pathological component at juvenile rheumatoid arthritis. The basic reflection of the development of dystrophic changes is the deficiency state of glycosaminoglycans (GAG), mainly due to GAG₂ (chondroitin-4-sulfates and dermatan sulfates) and GAG₃ (dermatan and keratan sulfates). Gender differences have been found, indicating a greater intensity of connective tissue metabolism in females.

Key words: children, adolescents, juvenile rheumatoid arthritis, reactive arthritis, glycosaminoglycans, hydroxyproline, collagenase.

Вступ

Останнім часом широко вивчається і обговорюється проблема змін, що відбуваються в сполучній тканині (СТ), і ролі якісного складу міжклітинного матриксу в біохімічних механізмах адаптації організму людини в умовах розвитку різних патологічних процесів (Гайко и др., 2013; Ким и др., 2005; Рекалов, Прыткова, 2012). Основна функція СТ – підтримка гомеостазу, тому її прогресуюча

дезорганізація і неспроможність адаптаційно-захисних механізмів є первинною основою розвитку ряду патологічних змін (дистрофічні процеси, фіброз). З іншого боку, самі захворювання досить часто є причиною зрушень в метаболізмі і розвитку функціональної недостатності СТ в цілому (Garnero et al., 2002; Rops et al., 2004).

Важливим поліфункціональним вмістом міжклітинної речовини СТ є кислі глікозаміноглікани (ГАГ), які в організмі людини представлені гіалуроновою кислотою, хондроїтинсульфатами і гепарансульфатами (Біохімія, 2003). Фракції ГАГ, що містяться в крові і сечі, відображають динаміку кількісного і якісного складу цих біополімерів в тканинах, у зв'язку з чим їх визначення має діагностичне значення і починає займати істотне місце в клінічній біохімії.

Виявлення порушень катаболізму волокнистих структур СТ, перш за все – колагену, має важливе клінічне значення, оскільки саме вони визначають розвиток фіброзу органів і тканин. Регулятором метаболізму колагену є тканинна колагеназа, яка в нормі синтезується клітинами СТ (фібробластами і макрофагами), знаходиться у вигляді чотирьох ізоформ і залежить від співвідношення в міжклітинному матриці її активаторів та інгібіторів. Серед активаторів особливу роль мають плазмін, калікреїн і катепсин В, що обумовлює її активацію при запальних процесах, особливо при аутоімунних захворюваннях (ревматоїдному артриті і системному червоному вовчаку) в результаті надмірного синтезу колагенази при імунній відповіді (Салугина, 2010; Marotte et al., 2009).

Найбільш істотні зміни у функціонуванні сполучнотканного матриксу викликають ревматичні хвороби, що приводить до різних ускладнень разом з основним патологічним процесом. Серед ревматичних захворювань дитячого віку особливе місце займає ювенільний ревматоїдний артрит (ЮРА) унаслідок вираженого впливу на економіку суспільства, здоров'я, якості життя хворих та їх сімей. Часто віддалений прогноз, ступінь інвалідизації цих пацієнтів пов'язані саме із збереженням функціонального стану опорно-рухової системи, м'язового компоненту, розвитком контрактур і артрозу уражених суглобів (Коваленко, Шуба, 2003; Костик и др., 2007; Рекалов 2012; Gabriel, 2001). В результаті впливу різноманітних механізмів запалення відбуваються ранні виражені порушення обміну структурних компонентів СТ, що клінічно виявляється хронічними прогресуючими змінами опорно-рухового апарату. З іншого боку, при ревматоїдному процесі компоненти деградації сполучнотканних структур, що мають і антигенні властивості, можуть брати участь в підтримці і подальшому прогресуванні імунологічного запалення (Рекалов, Прыткова, 2012).

Найбільш частою поразкою суглобів в дитячому віці є реактивний артрит (РеА), який у більшості пацієнтів при адекватній терапії закінчується повним одужанням. За відсутності ефективних лікувальних заходів дане захворювання може приймати хронічну течію і також приводити до значної функціональної недостатності суглобів, супроводжуватися розвитком різних ускладнень (артроз, остеопенія), що погіршує його прогноз і визначає необхідність тривалого лікування, зокрема після досягнення 18-річного віку (Di Cesare et al., 1996).

Параметри структурних компонентів екстрацелюлярного матриксу можуть використовуватися як інтегральний показник, що характеризує стан метаболізму і функціонування сполучнотканних утворень, ступінь їх деструкції і тривалість патологічного процесу, нашарування дистрофічних змін (Мохначева, 2012; Рекалов, Прыткова, 2012; Салугина, 2010; Marotte et al., 2009). Оскільки вміст біохімічних складових в міжклітинному матриці сполучної тканини при запальних захворюваннях суглобів у дітей освітлені недостатньо, метою дослідження було вивчення стану метаболізму сполучнотканних структур у дітей і підлітків із суглобовою формою ЮРА і зтяжними формами РеА.

Матеріали і методи дослідження

Під спостереженням знаходилося 89 пацієнтів 2–18 років зі встановленим діагнозом ЮРА (38 дітей, основна група) і пацієнти з РеА (51 хворий, група порівняння), зокрема 56 дівчаток і 33 хлопчика. Контрольну групу склали 25 здорових однолітків. У 23,07% пацієнтів тривалість хвороби склала до 12 міс., у 76,92% була більш 3-х років. Мінімальний ступінь активності захворювання на момент дослідження діагностований у 65,51% хворих, помірний – у 34,48%. У всіх хворих вивчена клінічна симптоматика з детальним обстеженням опорно-рухового апарату, яке включало огляд, пальпацію суглобів, оцінку їх функціональної здатності, виявлення запального процесу і визначення його ступеня, проведено рентгенологічне і ультразвукове дослідження суглобів.

Для оцінки обміну протеогліканів було вивчено кількість загальних ГАГ в сироватці крові та їх фракційний склад (хондроїтин-6-сульфати – ГАГ₁), хондроїтин-4-сульфати і дерматансульфати (ГАГ₂), високосульфатовані ГАГ – дерматан- і кератансульфати (ГАГ₃) (Штерн и др., 1982), загальних хондроїтинсульфатів (ХС) в сироватці крові, рівень уронових кислот (УК) в сечі (Горячковский, 2005; Морозенко и др., 2012). Про стан обміну колагену свідчив рівень екскреції оксипроліну (показник

розпаду колагену) в добовій сечі методом (Крель, Фурцева, 1968), а також колагенолітична активність крові (активність сумарних колагеназ з класу металопротеїназ) (Шараев и др., 1987).

Всі статистичні процедури проводили з використанням пакетів прикладних програм ліцензійної «Statistica» for Windows 6.0, «SPSS 16». Для оцінки вірогідності розходжень між групами використовували критерії Стюдента (t), Вілкоксона–Манна–Уїтні (u) і кутового перетворення Фішера (φ).

Результати та обговорення

Вивчення біохімічних параметрів обміну СТ показало, що у дітей і підлітків із запальними захворюваннями суглобів мають місце глибокі порушення в метаболізмі протеогліканів і колагенових волокон (табл. 1).

Таблиця 1.
Показники сполучнотканинних структур у дітей із запальними захворюваннями суглобів

Групи	Основна		Порівняння		Контрольна	
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
Показники						
ГАГ загальні, од.	38	10,53±2,28	56	11,72±4,52	25	12,10±0,42
ГАГ ₁ , од.	38	6,76±0,97	56	5,90±0,08	25	5,85±0,45
ГАГ ₂ , од.	38	2,13±0,65 ¹⁾	56	2,55±1,04 ¹⁾	25	3,90±0,40
ГАГ ₃ , од.	38	1,63±0,23 ¹⁾	56	3,35±1,40	25	2,80±0,40
ХС загальні, г/л	38	0,12±0,06	56	0,13±0,10	25	0,09± 0,01
УК, мг/доб.	38	3,65±0,91 ¹⁾	56	3,90±1,90	25	4,50±1,00
Оксипролін, мг/доб.	38	37,0±1,38 ¹⁾	56	46,66±14,15 ¹⁾	25	27,30±1,50
Колагеназа, мкмоль/л/год	18	13,45±0,62 ¹⁾	31	10,12±0,11	25	8,26±0,70

Примітка: ¹⁾ – p<0,001 в порівнянні з групою контролю.

Зміни в структурному складі ГАГ характеризувалися зниженням їх загальної кількості за рахунок ГАГ₂ і ГАГ₃ як в основній групі хворих, так і в групі порівняння (p<0,001). При цьому ступінь дефіциту ГАГ₂ і ГАГ₃ при ЮРА був достовірно вищий, ніж при РеА (p<0,001). Слід зазначити, що недостатність протеогліканів у хворих на ЮРА залежала від активності патологічного процесу (p<0,001) (табл. 2).

Таблиця 2.
Показники обміну сполучної тканини у хворих на ЮРА з урахуванням ступеня активності захворювання

Групи	Підлітки з різним ступенем активності захворювання						Всі хворі		Контрольна група	
	I ступінь		II ступінь		III ступінь					
	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m	n	M ± m
ГАГ загальні, од.	14	8,85±0,21	12	9,72±1,83	12	11,03±0,85	38	10,53±2,28	25	12,10±0,42
ГАГ ₁ , од.	14	5,75±0,07	12	6,66±0,36	12	6,44±0,87	38	6,76±0,97	25	5,85±0,45
ГАГ ₂ , од.	14	2,53±0,76	12	1,80±0,91	12	1,55±0,06 ²⁾	38	2,13±0,65	25	3,90±0,40
ГАГ ₃ , од.	14	1,83±0,56	12	1,51±0,49	12	1,35±0,06 ²⁾	38	1,63±0,23	25	2,80±0,40
ХС загальні, г/л	14	0,07±0,03	12	0,11±0,03	12	0,12±0,04	38	0,12±0,06	25	0,09± 0,01
УК, мг/доб.	14	3,85±2,19	12	3,03±1,45	12	4,02±0,24 ³⁾	38	3,65±0,91 ¹⁾	25	4,50±1,00
Оксипролін, мг/доб.	14	43,0±2,68	12	54,32±3,47	12	55,69±1,12 ²⁾	38	37,0±1,38 ¹⁾	25	27,30±1,50

Примітка: ¹⁾ – p<0,001 в порівнянні з групою контролю; ²⁾ – p<0,001 в порівнянні з I ступенем активності запального процесу; ³⁾ – p<0,001 в порівнянні з II ступенем активності запального процесу.

При аналізі змін сполучнотканинного матриксу залежно від рентгенологічної стадії патологічного процесу встановлено, що діти з ЮРА з II рентгенологічною стадією хвороби мали більш виражені

зміни в обміні протеогліканів, а саме: зменшення загальних ГАГ ($9,25 \pm 0,77$ од. проти $13,05 \pm 0,07$ од.; $p_t < 0,001$), ГАГ₂ ($1,80 \pm 0,42$ од. проти $2,75 \pm 0,06$ од.; $p_t < 0,05$) і ГАГ₃ ($1,10 \pm 0,56$ од.; $p_t < 0,01$). Слід зазначити, що показник вмісту як загальних ГАГ, так і їх фракцій достовірно не змінювався у хворих з РеА, що, імовірно, свідчить про вищий ступінь пошкодження ланки протеогліканів СТ при ревматоїдному артриті і відображає ризик розвитку дистрофічних змін тканин і велику вірогідність виникнення ускладнень при цьому захворюванні вже в дитячому віці. Віддзеркаленням дисбалансу ГАГ крові були зміни їх екскреції з добовою сечею. Вміст ГАГ був достовірно вище у хворих в порівнянні зі здоровими однолітками ($p_t < 0,001$). Слід зазначити, що у хворих з ЮРА рівень УК в сечі збільшувався залежно від ступеня запального процесу ($p_t < 0,001$).

Порушення обміну колагену при запальних захворюваннях суглобів у дітей виявлялося змінами колагенолітичної активності крові. Встановлено, що при ЮРА вона була значно вища, ніж при РеА ($p_u < 0,05$). Аналіз отриманих даних при різних варіантах захворювання визначив тенденцію до підвищення активності ферменту у хворих з моноартритом, порівняно з олігоартритом (на 26,5%; $p_u < 0,09$). При цьому слід зазначити, що при моноартриті активність ферменту збільшена у 73,3% хворих, а при олігоартриті – у 45,4% ($p_\phi < 0,01$). Виявлено також двократне збільшення колагенази саме на початкових етапах захворювання у цих пацієнтів в порівнянні з групою здорових ($p_u < 0,05$). На нашу думку, це обумовлено медикаментозною терапією, яку хворі отримують надалі, що дозволяє вважати ступінь активації колагенази одним з показників достатньої ефективності терапії. Зміни колагенолітичної активності крові супроводжувались відхиленнями у вмісті продуктів метаболізму колагену в добовій сечі (екскреція оксипроліну). Його рівень у хворих з патологією суглобів був достовірно вищий, ніж у здорових однолітків ($p_t < 0,01$), а у пацієнтів з ЮРА підвищувався при більш вираженому ступені активності запального процесу ($p_t < 0,001$).

При вивченні гендерних відмінностей виявлено значне зменшення вмісту загальних ГАГ та їх першої фракції, а також екскреції УК у хлопчиків. У дівчаток спостерігалось чітке підвищення загальних хондроїтинсульфатів, в 1,5 рази була вище колагенолітична активність, ніж у хлопчиків (медіана 20,1 і 13,8 відповідно; $p_u < 0,01$), що може свідчити про більшу інтенсивність метаболізму СТ у осіб жіночої статі.

Виявлена пряма кореляційна залежність середнього ступеня ($r=0,63$; $p < 0,05$) між параметрами екскреції оксипроліну і загальних ГАГ, що свідчить про поєднану зміну метаболізму як міжклітинної речовини, так і волокнистих структур матриксу СТ при запальних поразках суглобів.

Висновки

Отримані нами дані дозволяють вважати, що невід'ємною особливістю стану сполучної тканини не тільки при ревматоїдному, але і при реактивних артритах у дітей і підлітків є метаболічні зміни її структур, що супроводжуються прогресуючою втратою основних функціонально значущих компонентів екстрацелюлярного матриксу, але з більш вираженою патологічною складовою при ЮРА. Встановлено, що основним віддзеркаленням розвитку дистрофічних змін залишається дефіцитний стан ГАГ, переважно за рахунок другої і третьої фракцій.

Виявлені закономірності можуть сприяти кращому розумінню патогенетичних механізмів розвитку ускладнень при даних захворюваннях (артроз, контрактури, атрофія), розробці як діагностичних, так і лікувальних заходів, своєчасній цільовій профілактиці у хворих з цією важкою патологією. Можливо, вже в цій віковій категорії хворих однією з ланок терапії супроводу повинне стати більш раннє призначення засобів, що містять хондроїтинсульфати, остеотропні й міотрофічні препарати.

Список літератури

Биохимия: учеб. для вузов / Под ред. Е.С.Северина. – Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779с. /Biokhimiya: ucheb. dlya vuzov / Pod red. Ye.S.Severina. – Moskva: GEOTAR-MED, 2003. – 779s./

Гайко Г.В., Магомедов А.М., Калашников А.В. и др. Биохимические изменения в суставной хрящевой ткани у больных с различным течением идиопатического и диспластического коксартроза // Травма. – 2013. – Т.14, №2. – С. 12–16. /Gayko G.V., Magomedov A.M., Kalashnikov A.V. i dr. Biokhimicheskiye izmeneniya v sustavnoy khryashevoy tkani u bol'nykh s razlichnym techeniyem idiopaticheskogo i displasticheskogo koksartroza // Travma. – 2013. – Т.14, №2. – С. 12–16./

Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике. – Одесса: Экология, 2005. – 607с. /Goryachkovskiy A.M. Klinicheskaya biokhimiya v laboratornoy diagnostike. – Odessa: Ekologiya, 2005. – 607s./

Ким Л.Б., Куликов В.Ю., Асламова С.А. и др. Активность реакций перекисного окисления липидов и содержание гликозаминогликанов у больных сахарным диабетом первого типа с диабетической

- нефропатией // Бюлл. СО РАМН. – 2005. – №3. – С. 83–86. /Kim L.B., Kulikov V.Yu., Aslamova S.A. i dr. Aktivnost' reaktsiy perekisnogo oksleniya lipidov i soderzhaniye glikozaminoglikanov u bol'nykh sakharnym diabetom pervogo tipa s diabeticheskoy nefropatiyey // Byull. SO RAMN. – 2005. – №3. – С. 83–86./
- Коваленко В.М., Шуба І.М. Ревматичні хвороби суглобів: медико-соціальні проблеми в Україні та шляхи їх вирішення // Український ревматологічний журнал. – 2003. – Т.13, вип.3. – С. 3–8. /Kovalenko V.M., Shuba I.M. Revmatychni khvoroby suglobiv: medyko-sotsial'ni problemy v Ukraini ta shlyakhy yikh vyrishennya // Ukrayins'kyu revmatologichnyy zhurnal. – 2003. – Т.13, вып.3. – С. 3–8./
- Костик М.М., Воронцов І.М., Ларионова В.І. Оценка костного метаболизма у детей с хроническими артритами // Научно-практическая ревматология. – 2007. – №3. – С. 90–94. /Kostik M.M., Vorontsov I.M., Larionova V.I. Otsenka kostnogo metabolizma u detey s khronicheskimi artritami // Nauchno-prakticheskaya revmatologiya. – 2007. – №3. – С. 90–94./
- Крель А.А., Фурцева Л.Н. Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике // Вопросы мед. химии. – 1968. – Т.14, №6. – С.635. /Krel A.A., Furtseva I.N. Metody opredeleniya oksiprolina v biologicheskikh zhidkostyakh i ikh primeneniye v klinicheskoy praktike // Voprosy med. khimii. – 1968. – Т.14, №6. – С.635./
- Морозенко Д.В., Левченко В.І., Тимошенко О.П. Биохимические показатели состояния соединительной ткани в диагностике болезней: методические рекомендации. – Белая Церковь, 2012. – 42с. /Morozenko D.V., Levchenko V.I., Timoshenko O.P. Biokhimicheskiye pokazateli sostoyaniya soyedinitel'noy tkani v diagnostike bolezney: metodicheskkiye rekomndatsii. – Belaya Tserkov, 2012. – 42s./
- Мохначева С.Б. Выявление синдрома дисплазии соединительной ткани при заболеваниях височно-нижнечелюстного сустава // Современные наукоемкие технологии. – 2012. – №8. – С. 32–33. /Mokhnacheva S.B. Vyyavleniye sindroma displazii soyedinitel'noy tkani pri zabolevaniyakh visochno-nizhnechelyustnogo sustava // Sovremennyye naukoemykiye tekhnologii. – 2012. – №8. – С. 32–33./
- Рекалов Д.Г. Ранний ревматоидный артрит: клинико-диагностические маркеры и суставная деструкция // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – №3. – С. 119–121. /Rekalov D.G. Ranni revmatoidnyy artrit: kliniko-diagnosticheskiye markery i sustavnaya destruktziya // Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal. – 2012. – №3. – С. 119–121./
- Рекалов Д.Г., Прыткова А.В. Нарушение метаболизма соединительнотканых структур в дебюте ревматоидного артрита // Патология. – 2012. – №1. – С. 64–67. /Rekalov D.G., Prytkova A.V. Narusheniye metabolizma soyedinitel'notkannykh struktur v debyute revmatoidnogo artrita // Patologiya. – 2012. – №1. – С. 64–67./
- Салугина С.О. Нозологическая диагностика ювенильного артрита на разных этапах наблюдения // Современная ревматология. – 2010. – №3. – С. 22–27. /Salugina S.O. Nozologicheskaya diagnostika yuvenil'nogo artrita na raznykh etapakh nablyudeniya // Sovremennaya revmatologiya. – 2010. – №3. – С. 22–27./
- Шараев П.Н., Пишков В.Н., Зворыгина Н.Г. и др. Определение коллагенолитической активности плазмы крови // Лаб. дело. – 1987. – №1. – С. 60–62. /Sharayev P.N., Pishkov V.N., Zvorygina N.G. i dr. Opredeleniye kollagenoliticheskoy aktivnosti plazmy krovi // Lab. delo. – 1987. – №1. – С. 60–62./
- Штерн М.П., Тимошенко О.П., Леонтьева Ф.С., Ключева Г.Ф. Способ определения гликозаминогликанов в сыворотке крови. А.с. 960626 СССР, М. Кл 3.G 0,1 №33148. СССР. №2998857128 – 13. Заявл. 23.10.80. Опубл. 23.09.82. Бюл. №35. 2с. /Shtern M.P., Timoshenko O.P., Leontyeva F.S., Klyueva G.F. Sposob opredeleniya glikozaminoglikanov v syvorotke krovi. A.s. 960626 SSSR, M. Kl 3.G 0,1 № 33148. SSSR. – №2998857128 – 13; Zayavl. 23.10.80. Opubl. 23.09.82. Byul. №35. 2s./
- Di Cesare P.E., Carlson C.S., Stolerman E.S. et al. Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage // J. Orthop. Res. – 1996. – Vol.14, №6. – P. 946–955.
- Gabriel S.E. The epidemiology of rheumatoid arthritis // Rheum. Dis. Clin. North. Amer. – 2001. – №27. – P. 269–281.
- Garnero P., Gineyts E., Christgau S. et al. Association of baseline levels of urinary glucosyl-galactosylpyridinoline and type II collagen C-telopeptide with progression of joint destruction in patients with early rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. – 2002. – №46. – P. 21–30.
- Marotte H., Gineyts E., Miossec P. et al. Effects of infliximab therapy on biological markers of synovium activity and cartilage breakdown in patients with rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 2009. – №68. – P. 1197–2000.
- Rops A.L., Van der Vlag I., Lensen I.F. et al. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation // Kidney Int. – 2004. – Vol.65, no.3. – P. 768–785.

Представлено: Л.А.Страшок / Presented by: L.A.Strashok
Рецензент: Ю.Г.Кот / Reviewer: Yu.G.Kot
Подано до редакції / Received: 10.02.2016

••• БОТАНІКА ТА ЕКОЛОГІЯ РОСЛИН •••
••• BOTANY AND PLANT ECOLOGY •••

УДК: 581.48:582.923.5+581.526.5+581.522.4

Структура насінин сукулентних представників родини Аросупасеае
Я.В.Авєкін, Н.В.Нужина, М.М.Гайдаржи

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ботанічний сад ім. акад. О.В.Фоміна
(Київ, Україна)
avekinyaroslav@mail.ru, gaidarzhy@ukr.net

Проведено анатомо-морфологічні дослідження насінини чотирьох сукулентних представників родини Аросупасеае. За результатами досліджень встановлено, що структура насінин *P. lamerei*, *P. rutenbergianum*, *A. obesum* та *A. arabicum* подібна до інших мезофітних представників родини Аросупасеае за формою, скульптурою поверхні тести та типом ендосперму. Серед відмінностей було виявлено те, що теста досліджуваних видів має екзо-мезотестальний тип будови, що притаманно представникам родини Asclepiadaceae чи, за сучасними уявленнями, підродині Asclepiadoideae. Також було виявлено, що зародки досліджуваних видів мають більш розвинений потовщений гіпокотиль в порівнянні з мезофітними представниками цієї родини. Між таксонами *A. obesum* та *A. arabicum*, які за системою APG III об'єднані в один вид *A. obesum*, виявлено ряд відмінностей анатомічної будови насіння. Воно відрізняється розмірами, кольором, скульптурою поверхні, товщиною тести та типом будови її епідермальних клітин, що вказує на їх можливу неспорідненість.

Ключові слова: сукуленти, Аросупасеае, *Pachypodium lamerei*, *Pachypodium meridionale*, *Adenium obesum*, *Adenium arabicum*, теста, потовщені гіпокотилі, епідермальні клітини, APG III.

Структура семян суккулентных представителей семейства Аросупасеае
Я.В.Авєкин, Н.В.Нужина, М.М.Гайдаржи

Проведены анатомо-морфологические исследования семян четырех суккулентных представителей семейства Аросупасеае. По результатам исследований выявлено, что структура семян *P. lamerei*, *P. rutenbergianum*, *A. obesum* и *A. arabicum* схожа с другими мезофитными представителями семейства Аросупасеае по форме, скульптуре поверхности тесты и типу эндосперма. Среди различий было выявлено то, что теста исследуемых видов имеет экзо-мезотестальный тип строения, что свойственно представителям семейства Asclepiadaceae или, по современным представлениям, подсемейству Asclepiadoideae. Также было обнаружено, что зародыши исследуемых видов имеют более развитый утолщенный гипокотиль по сравнению с мезофитными представителями семейства. Между таксонами *A. obesum* и *A. arabicum*, которые по системе APG III объединены в один вид *A. obesum*, выявлен ряд отличий в анатомическом строении семян. Они отличаются размерами, цветом, скульптурой поверхности, толщиной тесты и типом строения ее эпидермальных клеток, что указывает на их возможную неродственность.

Ключевые слова: суккуленты, Аросупасеае, *Pachypodium lamerei*, *Pachypodium meridionale*, *Adenium obesum*, *Adenium arabicum*, теста, утолщенные гипокотили, эпидермальные клетки, APG III.

Structure of seeds of succulent representatives of Apocynaceae family
Y.A.Aviekin, N.V.Nuzhina, M.M.Gaidarzhy

Anatomical and morphological investigations of seeds of four succulent representatives of the family Apocynaceae have been conducted. According to the research, it has been found that the structure of the seeds of *P. lamerei*, *P. rutenbergianum*, *A. obesum* and *A. arabicum* is similar to other mesophytic representatives of the family Apocynaceae in shape, sculpture of the testa surface and endosperm type. Among the differences it has been found that the testa of studied species has exo-mesotestal type of structure, that is typical for representatives of the family Asclepiadaceae or, according to modern concepts, for subfamily Asclepiadoideae. It has been also found that embryos of the studied species have more developed thickened hypocotyl compared with mesophytic representatives of this family. Between the taxa *A. obesum* and *A. arabicum*, which are combined in one species *A. obesum* in the system APG III, there have been revealed a number of differences in the anatomical structure of

the seeds. They differ in size, color, surface sculpture, thickness of testa and the type of structure of its epidermal cells, which may indicate their possible non-affinity.

Key words: *succulents, Apocynaceae, Pachypodium lamerei, Pachypodium meridionale Adenium obesum, Adenium arabicum, testa, thickened hypocotyls, epidermal cells, APG III.*

Вступ

Родина Аросунасеае належить до дводольних квіткових рослин, що входять до порядку Gentianales. Включає близько 400 родів, серед яких зустрічаються дерева, чагарники, ліани і трави. Представники цієї родини розповсюджені майже на всіх континентах земної кулі, переважно в тропічній зоні, лише деякі види можуть траплятись у помірних широтах. Багато рослин цієї родини мають високу господарську (*Clitandra* Benth.), фармакологічну (*Apocynum cannabinum* L., *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz, *Strophanthus gratus* (Wall. and Hook.) Baill.) та декоративну цінність (*Nerium oleander* L., *Vinca minor* L.) (Тахтаджян, Федоров, 1981).

Основні анатомо-морфологічні дослідження насінин представників цієї родини проводились багатьма вченими (Тахтаджян, 1966; Шевченко, 1987; Allorge, 1985; Baillon, 1891; Leger, 1913; Maheswari Devi, 1964, 1970, 1971; Maheswari Devi, Narayana, 1975; Netolitzky, 1926; Nicolas, Baijnath, 1994; Rowley, 1988, 1999; Woodson, 1930). Авторами було опрацьовано більше ста таксонів рослин, які походили з різних геоботанічних районів планети. За результатами їх досліджень було виявлено, що насіння більшості представників формується в багатонасінних (*Allamanda* L., *Vahea* Lam.), рідше однонасінних плодах – листівках (*Gynopogon* Forst. Roxb.) з висячих анатропних (*Rauvolfia* Ruiz & Pav, *Tabernaemontana* Plum. ex L.), гемітропних (*Lepinia* Decne., *Nerium* L., *Voacanga* Stapf ex Elliott) або амфітропних (*Apocynum* L.) насінних зачатків (Maheswari Devi, 1964, 1970, 1971; Maheswari Devi, Narayana, 1975; Netolitzky, 1926). Розміри насінин коливаються від дрібного у *Apocynum* (1,5–2,0 мм завдовжки, 0,4–0,6 мм завширшки та 0,2–0,3 мм завтовшки) до середнього у *Nerium* (6–10 мм завдовжки, 1,5–2 мм завтовшки і завширшки). Форма насінин здебільшого еліпсоподібна, паличкоподібна (*A. androsaemifolium* L.) або яйцеподібна (*V. minor*), воно часто сплюснуте або здавлене з різних боків. Краї насінини іноді валикоподібні з поздовжніми гребнями на дорзальній стороні (*Lepinia solomonensis* Hemsl.). На вентральній стороні спостерігається борозна, валик чи невеликий кінь, що являє собою насінний шов (Сравнительная анатомия семян, 2010; Allorge, Couderc, 1983; Baillon, 1891; Leger, 1913; Maheswari Devi, Narayana, 1975; Woodson, 1930).

Майже у всіх досліджених рослин родини Аросунасеае спостерігається наявність анемохорного пристрою, який представлений волосоподібними виростами на поверхні тести, оформленою летючкою (султаном) або крилоподібною облямівкою (Сравнительная анатомия семян, 2010; Allorge, Couderc, 1983; Leger, 1913; Maheswari Devi, 1964).

За даними багатьох авторів відомо, що насіння більшості представників родини унітегмальне та екзотестальне, тобто теста формується з одного зовнішнього інтегументу і має просту анатомічну будову (Тахтаджян, 1966; Сравнительная анатомия семян, 2010; Шевченко, 1987; Maheswari Devi, 1970, 1971; Maheswari Devi, Narayana, 1975). Вона складається з епідермальних клітин, які мають прямокутну або округлу форму. Було виявлено, що клітини тести мають різноманітну будову в залежності від таксону (Netolitzky, 1926). У представників роду *Strophanthus* D.C. вони мають потовщення на бічних стінках або папілоподібний виріст на зовнішній стінці. У *Chilocarpus* Blume клітини епідерми тонкостінні, але покриті ззовні тонким гранулярним шаром. Представники роду *Lepinia* мають епідермальні клітини з потовщеною, лігніфікованою зовнішньою стінкою, а у видів *Beaumontia* Wall. вона дещо викривлена. У багатьох родів (*Funtumia* Desf., *Holarhena* R.Br., *Nerium*, *Wrightia* R.Br.) епідермальні клітини в халазальній зоні витягуються у довгі волоски, а в зоні мікропіле, де утворюються складки тести, епідермальні клітини формують папіли, які, витягуючись, формують летючку, що складається з декількох сотень волосків, які в основі дуже щільно прилягають один до одного (Сравнительная анатомия семян, 2010; Maheswari Devi, 1971; Nicolas, Baijnath, 1994; Rowley, 1988, 1999).

Поверхня тести також має різноманітну скульптуру в залежності від роду рослини, тому авторами L.Allorge (Allorge, Couderc, 1983; Allorge, 1985) та P.V.Leger (1913) було виділено 5 типів її будови: 1. Бургриста – поверхня тести вкрита одноклітинними горбками (*Ervatamia* L., *Voacanga* Stapf, *Stemmadenia* Benth.); 2. Сітчаста – утворена за рахунок потовщених борозн чи валиків (*Schizozygia* Baill., *Carvalhoa* K. Shum.), 3. Комірчаста – одноклітинні інвагінації на поверхні тести (*Bonafousia* A.DC., *Peschiera* (A.DC.) Miers., *Tabernaemontana*); 4. Складчасто-гребінчаста – на поверхні тести формуються складки та гребні (*Callichilia* Stapf); 5. Зморшкувата – насіннева шкірка з круговими

зморшкуватими складками (*Tabernaetheiboga* L.) (Сравнительная анатомия семян, 2010; Allorge, 1985; Allorge, Couderc, 1983; Leger, 1913).

Ендосперм нуклеарний, слабо розвинутий у деяких видів роду *Catharanthus* G.D з халазальним гаусторієм, а у представників родів *Chilocarpus*, *Ervatamia*, *Lepinia*, *Tabernaemontana* *Voacanga* він румінований. У багатьох видів ендосперм має вигляд тонкої плівки, яка оточує зародок і складається з декількох шарів (1–3) тонкостінних (*Tabernaemontana*) або товстостінних клітин (*Chilocarpus*, *Lepinia*). В них можуть накопичуватись масла (*Funtumia*), білкові тіла з глобоїдами (*Strophanthus*), крохмаль (*Wrightia*) або кристали оксалатів (*Thevetia* L.) (Maheswari Devi, 1970; Netolitzky, 1926, Periasamy, 1963).

Зародок прямий, займає весь об'єм насінини. Він може бути лопатоподібним (*Amsonia* Walter, *Arosynum*, *Nerium*, *Carissa* L.), язичкоподібним або складчастим (*Chilocarpus*, *Lepinia*, *Tabernaemontana*). За даними R.E.Woodson, в зародку можуть накопичуватись білки, а в зародкових листках *Arosynum hypericifolium* (Greene) Beg. було знайдено крохмаль. Також у виду *Rauvolfia serpentina* виявлена поліембріонія, додаткові зародки вірогідно утворюються з синергіди (Maheswari Devi, 1970; Woodson, 1930).

Варто відзначити, що насіння деяких представників родини Аросупасеае досліджене досить детально, але в якості дослідних об'єктів здебільшого виступали мезофітні рослини, що ростуть в схожих умовах. Незважаючи на те, що в родині Аросупасеае представлена умовна група сукулентних рослин, які мають ряд індивідуальних анатомо-морфологічних видозмін та особливостей, наукової інформації щодо будови їх насіння в доступній літературі знайдено недостатньо. Як відомо, представники сукулентної групи родини Аросупасеае належать до популярних елементів зеленого будівництва, квітникарства та, в окремих країнах, фармакологічної промисловості (Hoffmann, Cole, 1977; Rundel et al. 1995). Багато з них включені до списків МСОП та СІТЕС і є ендеміками в місцях їх природного зростання (Fuller, Fitzgerald, 1987; Golding, 2002; Checklist of CITES spec.).

Беручи до уваги ці проблеми, метою роботи було виявити анатомо-морфологічні особливості насінин представників сукулентної групи родини Аросупасеае на прикладі двох найбільших родів *Adenium* та *Pachypodium*.

Матеріали та методи

Досліджувалось насіння *Pachypodium lamerei* Drake, *Pachypodium rutenbergianum* Vatke, *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult. та *Adenium arabicum* Balf. f. Посівний матеріал зберігався в закритих пластикових посудинах при температурі +4–+6°C. Вибірка для кожного виду складала по 100 насінин. Дослідження проводились на базі науково-дослідної лабораторії Ботанічного саду ім. акад. О.В.Фоміна. Зразки фіксували в FAA (Formalin – Acetic Acid – Alcohol) та заливали в желатину за загальноприйнятою методикою (Ромейс, 1954). Зрізи насіння робили за допомогою заморожуючого мікротому та розглядали під світловим бінокуляром.

Поздовжні зрізи насіння забарвлювали сафраніном, розчином І2–КІ для виявлення крохмалю (Паушева, 1988). Описували будову насіння загальноприйнятими методами (Артюшенко, Федоров, 1979; Бондарцев, 1954). Заміри об'єктів здійснювались за допомогою програми ImageJ. Для статистичної обробки даних використовували програму Microsoft Excel.

Результати

В результаті дослідження встановлено, що насінини у *P. lamerei* витягнутої обернено-яйцеподібної форми, а у *P. rutenbergianum* вони обернено-яйцеподібної форми, білатерально сплющені на поперечному розрізі з відтягнутою мікропілярною зоною та розширеною халазою. Насінини *A. obesum* паличкоподібної, циліндричної форми, а у *A. arabicum* витягнутої веретеноподібної форми, у обох представників вони округлі на поперечному зрізі (табл. 1, рис. 1). Насінний шов, розміщений на вентральній стороні насінини, у *P. lamerei* та *P. rutenbergianum* тонкий і слабо помітний, натомість у *A. obesum* та *A. arabicum* має вигляд невисокого притупленого кіля. У деякої частини насінин *A. obesum* та *A. arabicum*, зібраного з одного плоду, спостерігалась відсутність чітко вираженого насінного шва і наявність лише незначного виросту біля мікропіле, що, на нашу думку, може залежати від особливостей їхньої локалізації у плоді.

Поверхня тести *P. lamerei* світло-жовтого кольору з зеленуватим відтінком, вкрита досить вираженими складками та гребнями (рис. 1. А). Епідермальні клітини розміщуються одним шаром, вони обернено-трапецієподібної чи циліндричної форми 63 ± 11 мкм завдовжки 27 ± 6 мкм завширшки, мають сітчасто потовщені стінки (рис. 2. А, Б, В, Г).

Таблиця 1.

Морфометричні показники насіння дослідних рослин родини Аросупасеае

Вид	Довжина (мм)	Ширина (мм)	Товщина (мм)
<i>A. arabicum</i>	12,3±0,8	2,4±0,3	2,7±0,3
<i>A. obesum</i>	11,2±0,6	1,6±0,3	1,6±0,3
<i>P. lamerei</i>	10,8±0,6	3,2±0,2	1,8±0,2
<i>P. rutenbergianum</i>	11,2±0,7	4,3±0,4	1,1±0,3

В результаті дослідження нами було встановлено ряд спільних та відмінних ознак спермодерми серед досліджуваних представників.

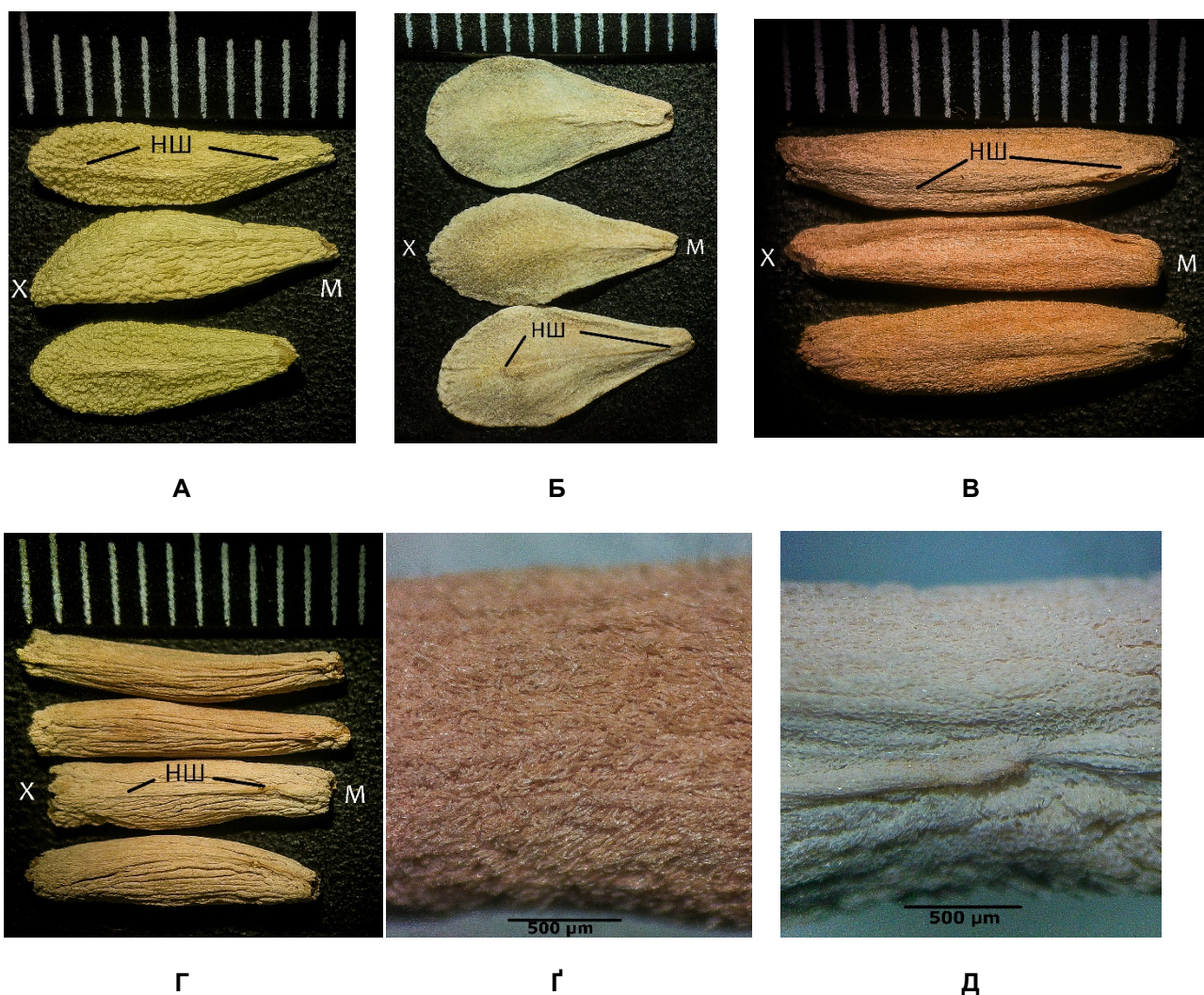


Рис. 1. Загальний вигляд насіння досліджуваних об'єктів: А – *P. lamerei*, Б – *P. rutenbergianum*, В – *A. arabicum*, Г – *A. obesum*, Г – поверхня тести *A. arabicum*, Д – поверхня тести *A. obesum*, М – мікропілярна сторона, Х – халазальна сторона, HШ – насінний шов

Під ним знаходиться шар з декількох рядів багатокутних, ізодіаметричних клітин діаметром 41 ± 12 мкм з тонкими клітинними стінками (рис. 2. А, Б, В, Г). Серед клітин цього шару спостерігаються зони часткової облітерації, особливо в зоні мікропіле (рис. 2. А). Варто відзначити, що в зоні складок ці клітини

можуть розміщуватись в 4–6 шари (231±39 мкм) на латеральній стороні і до 8–10 шарів в зоні халази (325±41 мкм) (табл. 2). Найглибший шар тести складається з сильно облітерованих клітин, загальною товщиною 34±9 мкм (рис. 2. Б, В, Г).

Таблиця 2.
Товщина тести в різних зонах насінини досліджуваних рослин родини Аросунасеае

Вид	Халазальний полюс (мкм)	Латеральна сторона (мкм)	Зона мікропіле (мкм)
<i>A. arabicum</i>	633±51	145±20	548±43
<i>A. obesum</i>	594±62	152±14	453±55
<i>P. lamerei</i>	124±23 – 378±34	124±23 – 265±27	368±24
<i>P. rutenbergianum</i>	227±21	128±17	215±28

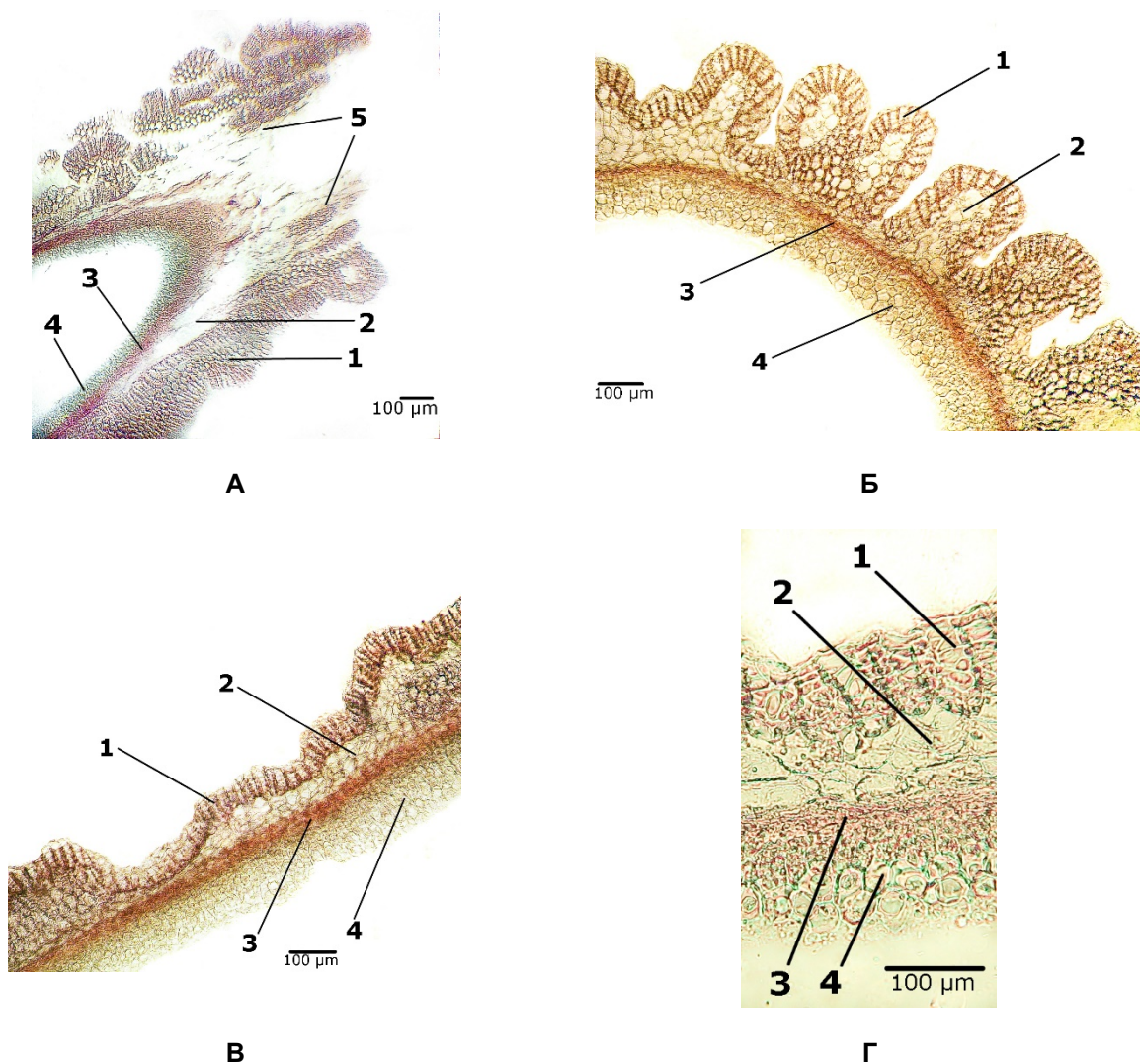


Рис. 2. Анатомічна будова тести *P. lamerei*: А – зона мікропіле, Б – халазальний полюс, В, Г – латеральна сторона: 1 – епідермальні клітини, 2 – субепідермальні клітини, 3 – облітерований шар, 4 – ендосперм, 5 – відкрите мікропіле

Поверхня тести *P. rutenbergianum* світло-сірого кольору, шорстка, попелястого або світло-кремового кольору. Поверхня тести рівна, лише біля халази, мікропіле та вздовж насінного шва спостерігаються поодинокі поздовжні гребні (рис. 1.Б).

Епідермальні клітини з сітчасто потовщеними антиклінальними стінками розміщуються в один ряд вертикально відносно площини насінини, мають циліндричну форму 63 ± 12 мкм завдовжки і 21 ± 3 мкм завширшки. Зовнішня клітинна стінка епідермальних клітин дещо витягнута в невелику папілу, довжина якої складає 12 ± 3 мкм в зоні халази та 21 ± 2 мкм на латеральній стороні (рис. 3. Б, В, Г). Варто відзначити, що епідермальні клітини в зоні мікропіле формують папілоподібні вирости периклінальної стінки 104 ± 19 мкм завдовжки зі спіралеподібним потовщенням (рис. 3. А, Д). Під епідермальним шаром знаходяться округлі, багатокутні тонкостінні клітини величиною 34 ± 16 мкм, які розміщуються в 1–2 ряди на латеральній стороні (72 ± 9 мкм) та до 4–5 рядів на халазальному полюсі (139 ± 14 мкм), що призводить до нерівномірного потовщення тести (табл. 2). Внутрішній шар клітин, який контактує з ендоспермом, сильно облітерований, 32 ± 5 мкм завтовшки (рис. 3. Б, В, Г).

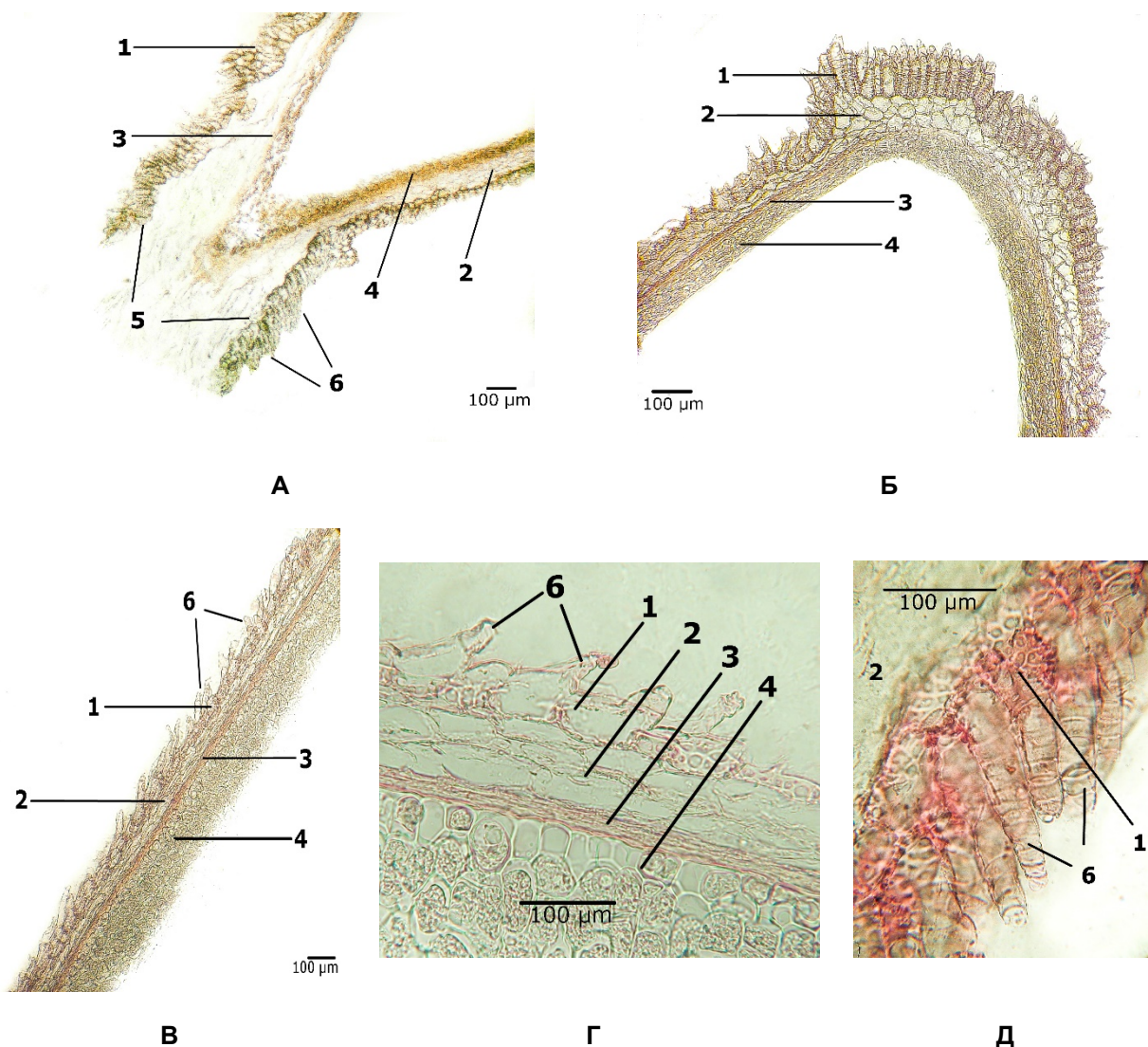


Рис. 3. Анатомічна будова тести *P. rutenbergianum*: А – зона мікропіле, Б – халазальний полюс, В, Г – латеральна сторона, Д – епідермальні клітини навколо мікропіле, 1 – епідермальні клітини, 2 – субепідермальні клітини, 3 – облітерований шар, 4 – ендосперм; 5 – відкрите мікропіле, 6 – папіли епідермальних клітин

Поверхня тести *A. obesum* кремового кольору, вкрита поздовжніми зморшками (рис. 1. Г, Д). Епідермальний шар на латеральній стороні складається з 1–2 рядів дещо витягнутих клітин 98 ± 12 мкм завдовжки та 37 ± 9 мкм завширшки з потовщеними лігніфікованими клітинними стінками. Клітини розміщуються горизонтально відносно площини насінини, протопласт відсутній. Ближче до халази і мікропіле кількість рядів цих клітин збільшується до 10–12, при цьому їхня форма змінюється на округлу 95 ± 14 мкм у діаметрі (рис. 4. А, Б, В, Г). Під цим шаром знаходяться ізодіаметричні багатокутні клітини 84 ± 16 мкм завбільшки, які мають тонкі здерев'янілі стінки. На латеральній стороні вони розміщуються в 3–4 ряди, а в зоні мікропіле і халази цей шар може не виявлятися. Варто відзначити, що більша частина цих клітин частково або повністю облітерована і втрачає свою клітинну структуру. Найглибший шар клітин тести тонкий (37 ± 13 мкм) і повністю облітерований (рис.4. А, Б, В, Г).

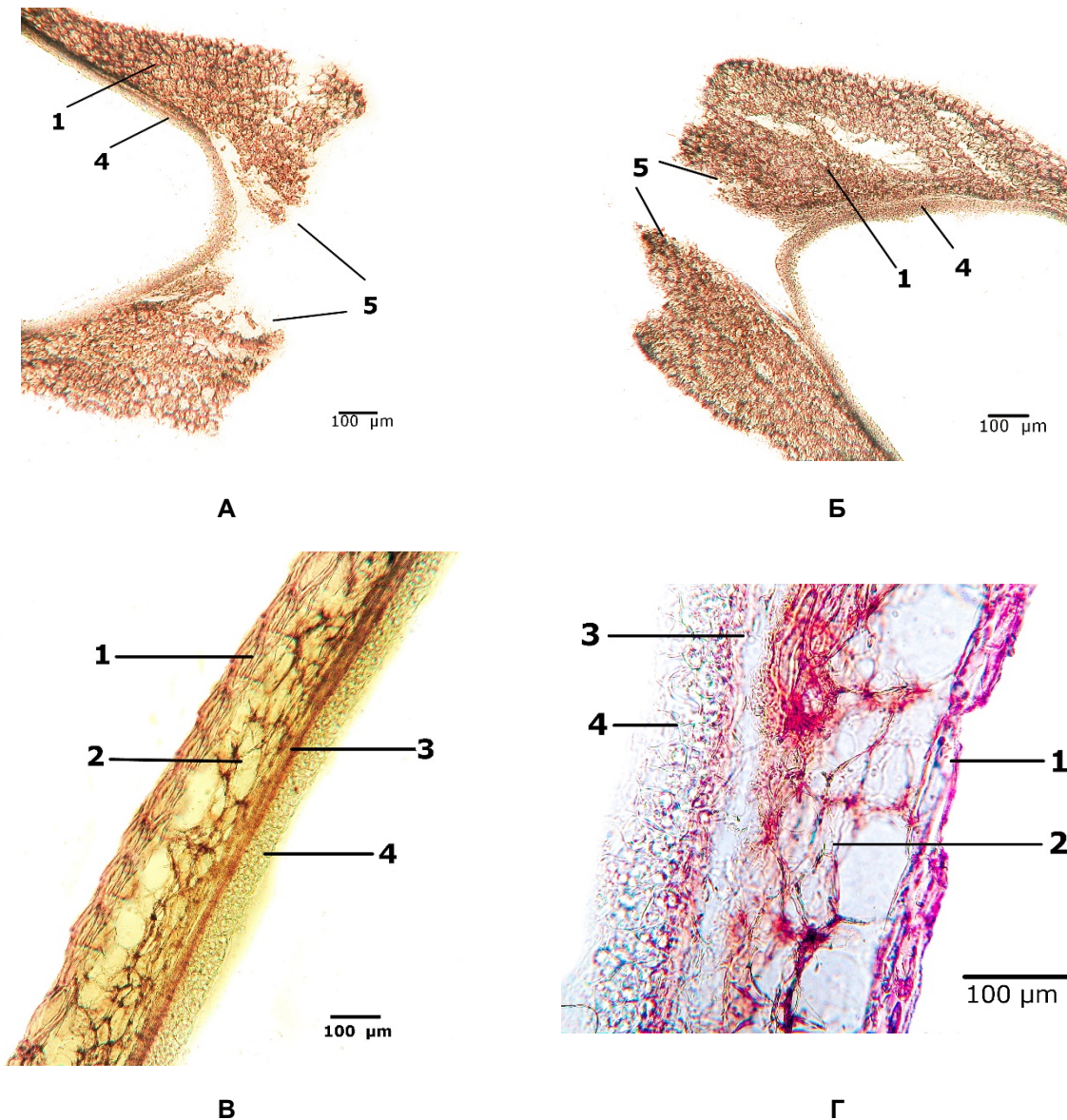


Рис. 4. Анатомічна будова тести *A. obesum*: А – зона мікропіле, Б – халазальний полюс, В, Г – латеральна сторона: 1 – епідермальні клітини, 2 – субепідермальні клітини, 3 – облітерований шар, 4 – ендосперм, 5 – відкрите мікропіле та халаза

Поверхня тести *A. arabicum* без видимих зморшок, рівна, торочкувата, бежевого кольору (рис. 1. В, Г). Епідермальні клітини тести з потовщеними лігніфікованими стінками дещо витягнутої округлої форми 98 ± 13 мкм завбільшки. На периклинальній стінці цих клітин спостерігається папілоподібний виріст 134 ± 19 мкм завдовжки, який має спіралеподібне потовщення по всій довжині. (рис. 5. Б, Г). На латеральній стороні епідермальні клітини розміщуються в 1–2 шари, їхня кількість поступово збільшується до 5–7 шарів в зоні халази і мікропіле (рис. 5. А, Б, В, Г).

Субепідермальний шар складається з клітин округлої, багатокутної форми 87 ± 13 мкм завбільшки, з тонкими клітинними стінками, частково облітеровані, розміщуються в 2–4 ряди на латеральній стороні та до 7 в зоні мікропіле та халази. Найглибший ряд клітин повністю облітерований 31 ± 17 мкм завтовшки (рис. 5. А, Б, В, Г).

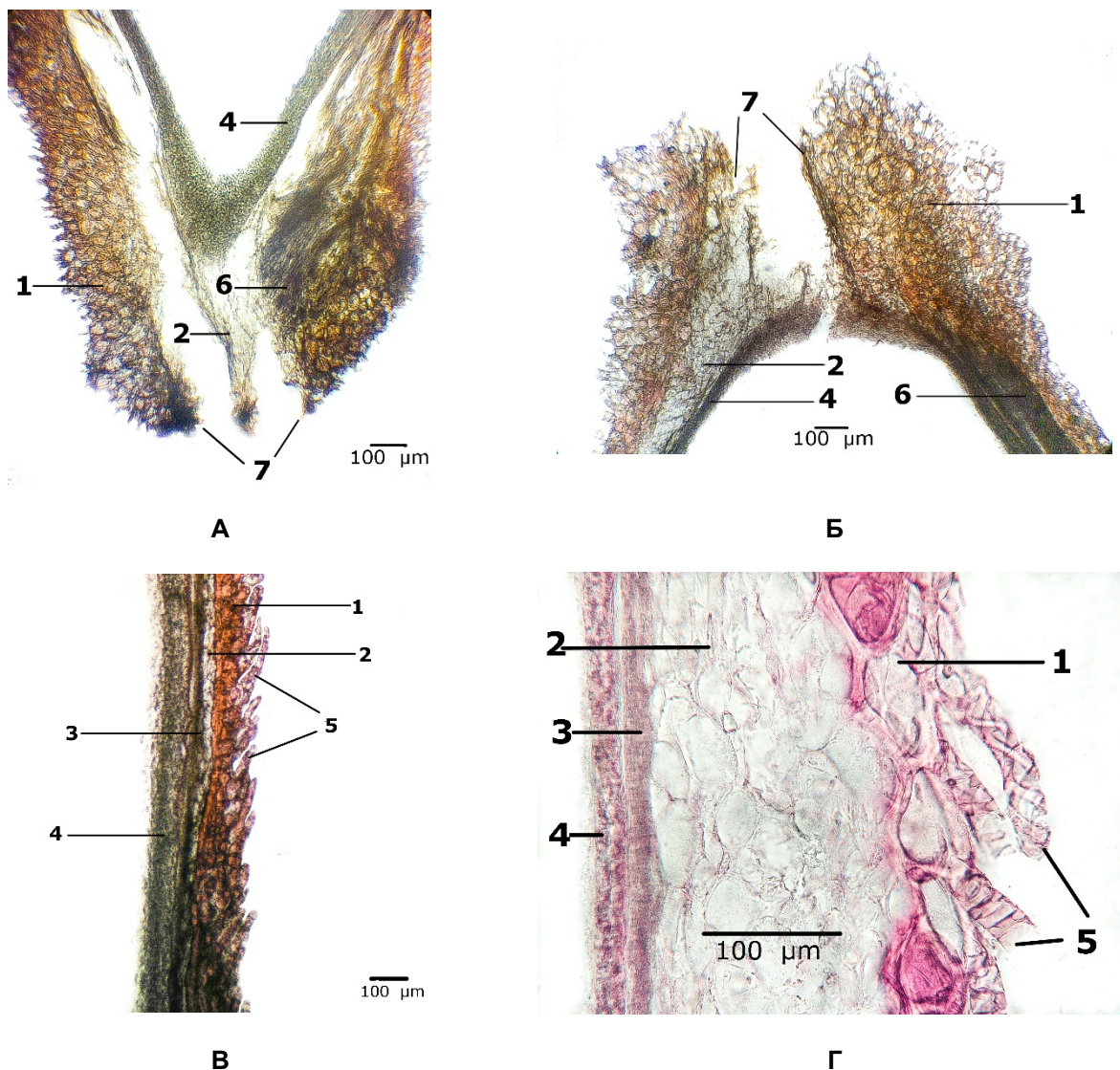


Рис. 5. Анатомічна будова тести *A. arabicum*: А – зона мікропіле, Б – халазальний полюс, В, Г – латеральна сторона: 1 – епідермальні клітини, 2 – субепідермальні клітини, 3 – облітерований шар, 4 – ендосперм, 5 – папіли епідермальних клітин, 6 – провідні пучки, 7 – відкрите мікропіле та халаза

У насінин всіх досліджуваних представників спостерігається наявність складок, що утворені шляхом нашарувань епідермальних клітин, які формують видовжене мікропіле. При цьому загальна товщина тести навколо мікропіле збільшується до 368 ± 24 мкм у *P. lamerei*, 215 ± 28 мкм у

P. rutenbergianum, 453 ± 55 мкм у *A. obesum* та 548 ± 43 мкм у *A. arabicum* (табл. 2). З епідермальних клітин, що оточують мікропіле, розвивається анемохорне пристосування (Maheswari Devi, Narayana, 1975). У *P. lamerei* та *P. rutenbergianum* він представлений у вигляді летючки (султана), що складається з одноклітинних волосків 55 ± 5 завдовжки (рис. 6, 7). У *A. obesum* та *A. arabicum*, крім апікальної, наявна додаткова летючка в зоні халази, де також спостерігається утворення складок з епідермальних клітин, що збільшують товщину тести до 594 ± 62 мкм у першого та до 633 ± 51 мкм у другого об'єкта. Біполярність анемохорного пристрою, який складається з волосків 65 ± 50 мм, характерна для представників роду *Adenium* (рис. 6, 7) (Rowley, 1999).

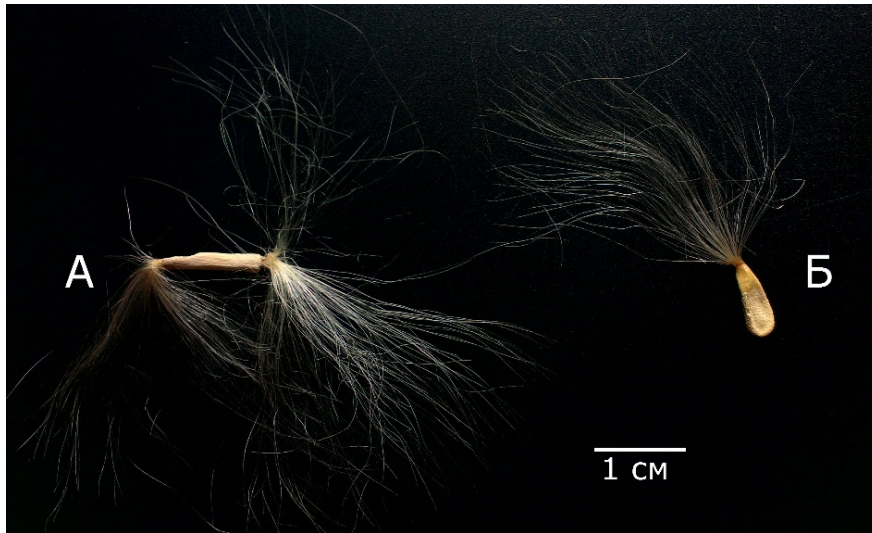


Рис. 6. Загальний вигляд насіння *A. obesum* (А) та *P. lamerei* (Б) з присутнім анемохорним пристроєм

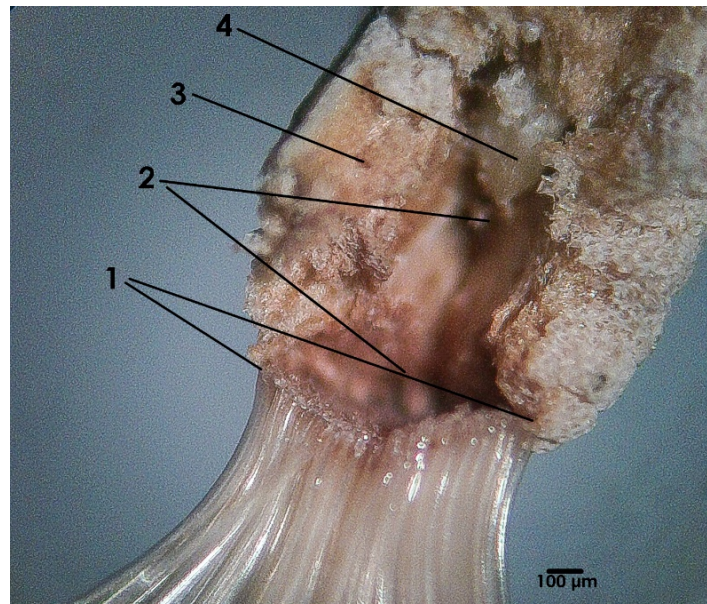


Рис. 7. Тангентальний зріз зони мікропіле *A. obesum*: 1 – основа анемохорного пристрою; 2 – мікропіле; 3 – теста; 4 – зародковий корінець

У процесі дослідження було виявлено, що у дозрілих насінин сформоване анемохорне пристосування легко відділяється з частиною тести, що його оточує (рис. 7). При цьому мікропілярна частина тести відкривається, в результаті чого оголюється зона зародкового корінця з частиною оточуючого його ендосперму (рис. 2. А, 3. А). У *A. obesum* та *A. arabicum* відділення летючок відбувається з обох сторін, в результаті відкривається мікропілярна зона тести (рис. 4. А, 5. А, 7), а на халазальній частині утворюється перфорована зона (рис. 4. Б, 5. Б).

Ендосперм в насінні досліджуваних рослин нуклеарного типу, присутній в незначній кількості в порівнянні з внутрішнім об'ємом насінини і займає периферичне положення відносно зародку у вигляді тонкої плівки. У *P. lamerei*, *P. rutenbergianum* клітини ендосперму округлі, іноді з облітерованими стінками розміром 37 ± 6 мкм, оточуючи зародок, розміщуються в 3–4 ряди загальною товщиною 121 ± 19 мкм (рис. 2, 3. А, Б, В, Г). У *A. obesum*, *A. arabicum* ендосперм товщиною 47 ± 22 мкм, складається з мілких округлих, сильно облітерованих клітин 9 ± 3 мкм в діаметрі (рис. 4, 5. А, Б, В, Г).

Зародок у *P. lamerei* та *P. rutenbergianum* прямий лопатеподібний кремового кольору, майже повністю повторює форму насінини і займає весь її внутрішній об'єм. У *P. lamerei* він $9,2 \pm 0,3$ мм завдовжки та $2,4 \pm 0,2$ мм у діаметрі. На його поздовжньому зрізі можна виділити зародкові листки, які щільно прилягають один до одного і складають близько 30% його об'єму ($3,2 \pm 0,3$ мм завдовжки), та потовщений стеблекорінь, що займає близько 70% зародка ($6,3 \pm 0,3$ мм завдовжки) (рис. 8. Г). У *P. rutenbergianum* довжина зародку $10,3 \pm 0,4$ мм, ширина $3,8 \pm 0,3$ мм, товщина $0,8 \pm 0,3$ мм. Зародкові листки дещо більші, ніж у *P. lamerei*, на них припадає приблизно 40% об'єму зародка ($4,1 \pm 0,2$ мм завдовжки). Стеблекорінь займає близько 60% об'єму зародка ($5,7 \pm 0,3$ мм) (рис. 8. В).

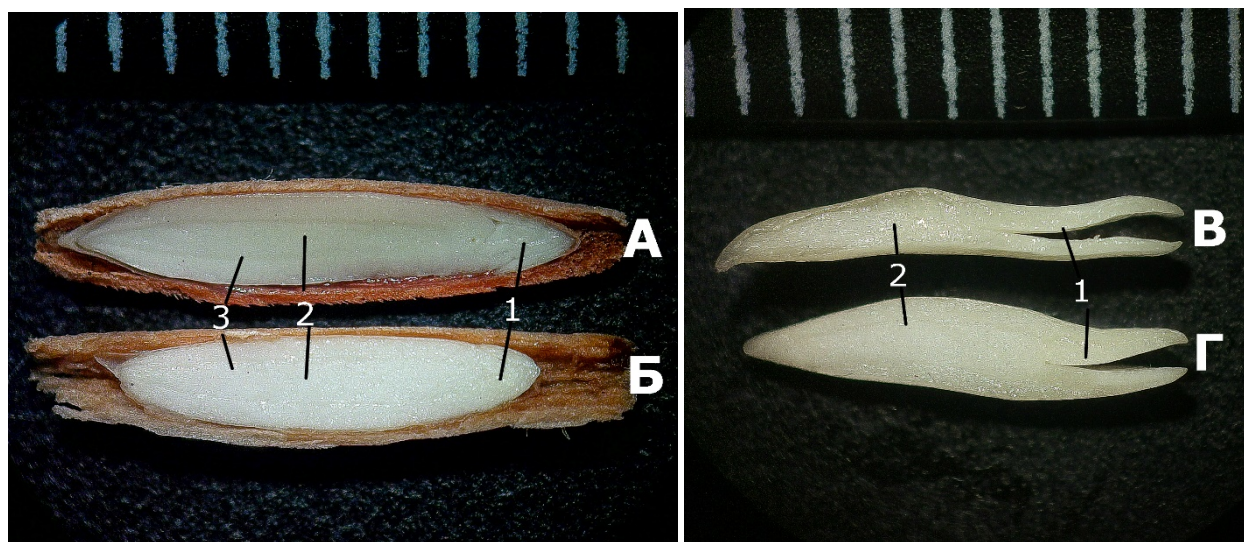


Рис. 8. Поздовжній зріз зародків досліджуваних рослин: А – *A. arabicum*; Б – *A. obesum*; В – *P. rutenbergianum*; Г – *P. lamerei*; 1 – зародкові листки, 2 – стеблекорінь, 3 – прокамбій

Зародок *A. obesum* та *A. arabicum* осьовий, веретеноподібної форми, на поперечному зрізі циліндричний, заповнює майже весь внутрішній об'єм насінини. Його величина коливається від $9,3 \pm 0,2$ мм завдовжки та $2,2 \pm 0,1$ мм в діаметрі у *A. obesum* та до $10,4 \pm 0,3$ мм завдовжки, $2,4 \pm 0,3$ мм в діаметрі у *A. arabicum*. У обох представників зародок має однорідний кремовий колір з вираженим прокамбієм на поздовжньому зрізі (рис. 8. А, Б). Зародкові листки досить щільно закручені і займають близько 20% від величини зародку ($1,7 \pm 0,2$ мм завдовжки у *A. obesum*, $2,6 \pm 0,2$ мм у *A. arabicum*), приблизно 80% всього об'єму займає потовщений стеблекорінь ($7,5 \pm 0,3$ мм завдовжки у *A. obesum*, $8,9 \pm 0,3$ мм у *A. arabicum*). При обробці зрізів насіння досліджуваних видів реагентом І2–КІ присутність крохмалю в зародку да ендоспермі не було виявлено.

Обговорення

Таким чином, встановлено, що насіння *Pachypodium lamerei*, *Pachypodium meridionale*, *Adenium obesum* та *Adenium arabicum* має ряд спільних ознак, які є характерними для більшості представників

родини Аросунасеае. Це наявність анемохорного пристрою, сухої та крихкої тести. До того ж скульптура її поверхні має подібні характеристики з іншими представниками цієї родини. Так, у *P. lamerei*, *P. rutenbergianum* та *A. obesum* вона подібна до четвертого типу будови (складчасто-гребінчаста), а у *Adenium arabicum* спостерігається подібність до першого типу будови (горбкувата).

Але варто відзначити, що за анатомічною будовою теста досліджуваних видів відрізняється від структури, характерної для мезофітних представників родини Аросунасеае. Насінні покриви у більшості досліджених представників родини Аросунасеае екзотестального типу і складаються з одного шару епідермальних клітин. Виключення складають окремі представники роду *Thevetia*, у яких спостерігається до 3 шарів епідермальних клітин (Сравнительная анатомия семян, 2010; Leger, 1913; Maheswari Devi, Narayana, 1975; Netolitzky, 1926). У досліджених видів спостерігається більш складна організація насінневої шкірки, що за будовою подібна до представників близької родини Asclepiadaceae, яка за сучасною системою APG III входить до складу родини Аросунасеае, наразі як підродина Asclepiadoideae, в якій представлено більше 30 родів сукулентних рослин, ареали яких включають ареали родів *Adenium* та *Pachypodium* (Endress, Bruyns, 2000; Endress et al., 2014). За даними авторів (Сравнительная анатомия семян, 2010; Netolitzky, 1926; Maheswari Devi, 1964), у представників підродина Asclepiadoideae теста екзо-мезотестального типу та має багат шарову будову. Екзотеста представлена 1–2 шарами циліндричних або округлих клітини з тонкими чи потовщеними клітинними стінками. Субепідермальний шар представлений мезотестом і складається з округлих або сплюснених клітин з більш тонкими стінками, які розміщуються в декілька шарів (від 1 до 4). Більш глибокі шари клітин облітерують до безструктурної плівки (Сравнительная анатомия семян, 2010; Maheswari Devi, 1964, 1970; Netolitzky, 1926). Даний опис будови тести подібний до будови насінної шкірки досліджуваних представників родів *Adenium* та *Pachypodium*. Це дає змогу припустити, що дані роди, за анатомічною будовою насінної шкірки, мають більшу спорідненість з родиною Asclepiadaceae, чи підродиною Asclepiadoideae за сучасним уявленням, ніж з іншими мезофітними представниками родини Аросунасеае.

Також варто звернути увагу на те, що за сучасною системою APG III таксон *A. arabicum*, який був виділений і описаний Ісааком Бейлі Бальфуром в 1888 році як окремий вид, віднесений у синоніми виду *A. obesum* (Angiosperm Phylogeny Website, 2012; IPNI, 2010). Незважаючи на сучасний стан таксону *A. obesum*, нами були виявлені чіткі відмінності будови насіння цих двох таксонів. Виявлено, що насіння *A. arabicum* в середньому на $1,2 \pm 0,7$ мм довше та на $1,1 \pm 0,3$ мм ширше від насіння *A. obesum*. Поверхня тести *A. obesum* має виражену поздовжньо-зморшкувату скульптуру та кремовий колір, при цьому теста *A. arabicum* має більш темний бежевий колір і рівну поверхню. Також серед цих двох таксонів спостерігається відмінність будови епідермальних клітин тести, відтак у *A. obesum* вони округлі або веретеноподібні, у *A. arabicum* вони злегка витягнутої округлої форми, дещо більші та додатково мають папілоподібні вирости зовнішньої периклінальної клітинної стінки (рис. 1. Г, Д).

З огляду на вищесказане, ми припускаємо, що таксономічний статус даних таксонів, можливо, потребує перегляду.

Ендосперм досліджених рослин має подібну будову з іншими представниками родини Аросунасеае, причому у *P. lamerei* та *P. rutenbergianum* він більш розвинутий, ніж у *A. obesum* та *A. arabicum*.

Зародок у дослідних рослин має великі розміри та досить розвинутий потовщений гіпокотиль, де, вірогідно, накопичується більшість поживних речовин. З літературних джерел відомо, що більшості досліджених мезофітних представників родини Аросунасеае не притаманне потовщення стеблекореневої зони зародку (Поддубная-Арнольди, 1982; Сравнительная анатомия семян, 2010; Netolitzky, 1926; Martin, 1946; Woodson, 1930). Навпаки, більшість представників характеризуються досить розвиненими зародковими листками, в яких локалізується запас поживних речовин (*Arosynum hypericifolium*, *Marsdenia cundurango* Rchb.f., *Vincetoxicum officinale* Moench.), та в 2–3 рази меншим за розміром вузьким циліндричним стеблекоренем. До того ж окремим мезофітним представникам цієї родини притаманна румінація ендосперму, що вказує на збільшення його об'єму та потужності. При цьому запас поживних речовин в зародку, а вслід за цим і потовщення окремих його частин, не відбуваються (Сравнительная анатомия семян, 2010; Periasamy, 1963). Тому виявлене потовщення гіпокотिला у дослідних рослин, який за об'ємом переважає над іншими частинами зародку, та слабкий розвиток ендосперму свідчить, що у сукулентних представників родини Аросунасеае основний запас поживних речовин локалізується в зародку, а саме в потовщеному стеблекорені (Сравнительная анатомия семян, 2010; Lubbock, 1892).

Висновки

Насіння *P. lamerei*, *P. rutenbergianum*, *A. obesum* та *A. arabicum* подібні до інших представників родини Аросупасеае за розмірами, формою, скульптурою поверхні тести та типом ендосперму. Зародок має ряд відмінностей, так як має більш розвинений потовщений гіпокотиль в порівнянні з мезофітними представниками цієї родини. Анатомічні особливості будови насінної шкірки вказують на те, що за типом будови вона екзо-мезотестальна, що притаманно представникам родини Asclepiadaceae чи, за сучасними уявленнями, підродині Asclepiadoideae. Між таксонами *A. obesum* та *A. arabicum*, які за системою APG III об'єднані в один вид *A. obesum*, виявлено ряд відмінностей анатомічної будови насіння. Воно відрізняється розмірами, кольором, скульптурою поверхні, товщиною тести та типом будови її епідермальних клітин, що вказує на їх можливу неспорідненість.

Список літератури

- Артюшенко З.Т., Федоров А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. – Л.: Наука, 1979. – 296с. /Artyushenko Z.T., Fedorov A.A. Atlas po opisatel'noy morfologii vysshikh rasteniy. – L.: Nauka, 1979. – 296s./
- Бондарцев А.С. Шкала цветов (пособие для биологов при научных и научно-прикладных исследованиях). – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1954. – 28с. /Bondartsev A.S. Shkala tsvetov (posobiye dlya biologov pri nauchnykh i nauchno-prikladnykh issledovaniyakh). – M.-L.: Izd-vo AN SSSR, 1954. – 28s./
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271с. /Pausheva Z.P. Praktikum po tsitologii rasteniy. – M.: Agropromizdat, 1988. – 271s./
- Поддубная-Арнольди В.А. Характеристика семейств покрытосеменных растений по цитозембриологическим признакам. – М., 1982. – 352с. /Poddubnaya-Arnol'di V.A. Kharakteristika semeystv pokrytosemennykh rasteniy po tsitoembriologicheskim priznakam. – M., 1982. – 352s./
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Иностранная литература, 1954. – 718с. /Romeys B. Mikroskopicheskaya tekhnika. – M.: Inostrannaya literatura, 1954. – 718s./
- Сравнительная анатомия семян. Том 7. Двудольные. Lamiidae, Asteridae / Под ред. А.Л.Тахтаджяна. – СПб: Наука, 2010. – С. 85–109. /Srnavnitel'naya anatomiya semyan. Tom 7. Dvudol'nyye. Lamiidae, Asteridae / Pod red. A.L.Takhtadzhyan. – SPb: Nauka, 2010. – S. 85–109./
- Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. – М.-Л., 1966. – 611с. /Takhtadzhyan A.L. Sistema i filogeniya tsvetkovykh rasteniy. – M.-L., 1966. – 611s./
- Тахтаджян А.Л., Федоров А.А. Жизнь растений. – М.: «Просвещение», 1981. – Т.5 (2). – С. 359–362. /Takhtadzhyan A.L., Fedorov A.A. Zhizn' rasteniy. – M.: «Prosveshcheniye», 1981. – T.5 (2). – S. 359–362./
- Шевченко С.В. Семейство Аросупасеае // Сравнительная эмбриология цветковых растений. Davidiaceae – Asteraceae. – Л., 1987. – 315с. /Shevchenko S.V. Semeystvo Apocynaceae // Sravnitel'naya embriologiya tsvetkovykh rasteniy. Davidiaceae – Asteraceae. – L., 1987. – 315с./
- Allorge L. Contribution a l'etude des grains des Apocynaceae – Tabernaemontanoideae: origin de l'arille et ornamentation du tegument seminal // Bull. Mus. Natn. Hist. Nat. Ser.4. – 1985. – T.7, no.4. – P. 433–451.
- Allorge L., Couderc H. La syncarpie chez Tabernanthe et sa particularite dans la sous-famille des Tabernaemontanoideae (Apocynaceae) // Bull. Mus. Natn. Hist. Nat. Ser.4. – 1983. – T.5, no.2. – P. 223–236.
- Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, 2012. (<http://www.mobot.org>).
- Baillon H.E. Bignoniacees. Gesneriacees. Gentinacees. Apocynacees. Asclepidacees. Convolvulacees. Polemoniacees. Boraginacees. Acanthacees // Historie des plantes. T.10. – Paris, 1891. – 455p.
- Checklist of CITES species (<http://checklist.cites.org>)
- Endress M.E., Bruyns P.V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. // The Botanical Review. – 2000. – Vol.66 (1). – P. 1–56.
- Endress M.E., Liede-Schumann S., Meve U. An updated classification for Apocynaceae // Phytotaxa. – 2014. – Vol.159. – P. 175–194.
- Fuller D., Fitzgerald S. Conservation and commerce of cacti and other succulents. – Washington: Traffic, 1987. – 264p.
- Golding J. Southern African Plant Red Data Lists. – Pretoria: SABANET, 2002. – 249p.
- Hoffmann J.J., Cole J.R. Phytochemical investigation of *Adenium obesum* Forskal (Apocynaceae): isolation and identification of cytotoxic agents // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1977. – Vol.66, no.9. – P. 1336–1337.
- IPNI. Id: 76358-1. V.1.3, 2010. (<http://www.ipni.org>)
- Leger P.V. Recherches sur la structure anatomique du tegument seminal des Apocynacees et des Asclepiadacees: These. – Paris, 1913. – 215p.
- Lubbock J. Contribution to our knowledge of seedlings. – London, 1892. – Vol.2. – 328p.

- Maheswari Devi H. Embryological studies in Asclepiadaceae // Proc. Indian Acad. Sci. – 1964. – Vol.60B, no.1. – P. 52–65.
- Maheswari Devi H. Embryological studies in Gentianaceae: Gentianoideae and Menyanthoideae // Proc. Indian Acad. Sci. – 1964. – Vol.56, no.4. – P. 195–216.
- Maheswari Devi H. Embryology of Apocynaceae-1. Plumiereae // J. Indian Bot. Soc. – 1971. – Vol.50, no1. – P. 74–85.
- Maheswari Devi H. Embryology of *Rauvolfia serpentina* and *Catharanthus roseus* // Curr. Sci. (India). – 1970. – Vol.39, no.13. – P. 376–377.
- Maheswari Devi H., Narayana K.L. Embryology of two cultivars of *Nerium indicum* Mill. // Curr. Sci. (India). – 1975. – Vol.44, no.7. – P. 641–642.
- Martin A.C. The comparative internal morphology of seeds // Amer. Midland. Natur. – 1946. – Vol.36, no.3. – P. 513–660.
- Netolitzky F. Anatomie der Angiospermen-Samen. – Handb. Pflanzenanat. Berlin, 1926. – Bd 10. – 364p.
- Nicholas A., Baijnath H. A consensus classification for the order Gentianales with additional details on the suborder Apocynineae // Bot. Rev. – 1994. – Vol.60, no.4. – P. 440–482.
- Periasamy K. Studies on seeds with ruminant endosperm. III. Development of rumination in certain members of the Apocynaceae // Proc. Indian Acad. Sci. – 1963. – Vol.58, no.6. – P. 316–328.
- Rowley G. Pachypodium & Adenium // Cactus File. – 1999. – No.5. – P. 1–79.
- Rowley G. The illustrated encyclopedia of succulents. – London: Salamander book, 1988. – 256p.
- Rundel R.W., Cowling R.M., Esler J. et al. Winter growth phenology and leaf orientation in *Pachypodium namaquanum* (Apocynaceae) in the succulent karoo of the Richtersveld, South Africa // Oecologia. – 1995. – Vol.101. – P. 472–477.
- Woodson R.E. Studies in the Apocynaceae. A critical study of the Apocynoideae (with special reference to the genus *Apocynum*) // Ann. Missouri Bot. Gard. – 1930. – Vol.17, no. 1–2. – 212p.

Представлено: Л.І.Буюн / Presented by: L.I.Buyun

Рецензент: В.В.Жмурко / Reviewer: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 22.12.2015

УДК: 574.3. 3.504

Ценопопуляції клоноутворюючих чагарничкових рослин лісових угруповань Національного природного парку «Деснянсько-Старогутський» I.M.Коваленко

Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна)
kovalenko_977@ukr.net

Проведено дослідження онтогенетичної структури трьох видів чагарникового ярусу в лісових екосистемах Національного природного парку «Деснянсько-Старогутський»: *Calluna vulgaris* (L.) Hull. – в 3-х асоціаціях, *Vaccinium myrtillus* L. – в 5-ти асоціаціях, *Vaccinium vitis-idaea* L. – в 4-х асоціаціях. На основі вибірки з 12321 парціальних кущів зроблені висновки про стан ценопопуляцій. Серед вивчених нами ценопопуляцій у лісових екосистемах переважають моноmodalні з одним піком чисельності. Ценопопуляції *C. vulgaris* були однаково неповночленними, але відрізнялися за характером вікових спектрів. Наймолодшою (індекс віковості ценопопуляції дорівнював лише 0,09) була ценопопуляція *C. vulgaris* в асоціації Pinetum callunoso-hylocomiosum. Всі п'ять ценопопуляцій *V. myrtillus* при різній їх віковості мали подібні індекси генеративності, які знаходяться на рівні 41–54 %. Всі досліджувані ценопопуляції брусниці є неповночленними, моноmodalними, але піки вікових спектрів знаходились в різній зоні через неоднаковий вік ценопопуляцій *V. vitis-idaea*. Переважна більшість ценопопуляцій клоноутворюючих рослин трав'яно-чагарникового ярусу виявилися центрованими з піком чисельності, який припадає на генеративні особини.

Ключові слова: ценопопуляції рослин, онтогенетична структура, лісові екосистеми, еколого-фітоценотичні умови, генеративність та віковість ценопопуляцій.

Ценопопуляції клонообразующих кустарничковых растений лесных экосистем Национального природного парка «Деснянско-Старогутский» И.М.Коваленко

Проведены исследования онтогенетической структуры трех видов растений кустарничкового яруса в лесных экосистемах Национального природного парка «Деснянско-Старогутский»: *Calluna vulgaris* (L.) Hull. – в 3-х ассоциациях, *Vaccinium myrtillus* L. – в 5-ти ассоциациях, *Vaccinium vitis-idaea* L. – в 4-х ассоциациях. На основании выборки из 12321 парциальных кустов сделаны выводы о состоянии ценопопуляций. Среди изученных нами ценопопуляций в лесных экосистемах преобладают моноmodalные с одним пиком численности особей. Ценопопуляции *C. vulgaris* были одинаково неполночленными, но отличались по характеру возрастных спектров. Молодой (индекс возрастности ценопопуляции равнялся лишь 0,09) была ценопопуляция *C. vulgaris* в ассоциации Pinetum callunoso-hylocomiosum. Все пять ценопопуляций *V. myrtillus* при разной их возрастности имели подобные индексы генеративности, которые находились на уровне 41–54 %. Все исследуемые ценопопуляции брусники являются неполночленными, моноmodalными, но пики возрастных спектров находились в разной зоне из-за неодинакового возраста ценопопуляций *V. vitis-idaea*. Преимущественное большинство ценопопуляций клонообразующих растений травянисто-кустарничкового яруса оказались центрированными с пиком численности, приходящимся на генеративные особи.

Ключевые слова: популяции растений, онтогенетическая структура, лесные экосистемы, эколого-фитоценотические условия, генеративность и возрастность ценопопуляций.

Coenopopulations of clone forming subshrub plants in forest ecosystems of Desnyansko-Starogutsky National Nature Park I.M.Kovalenko

Ontogenetic pattern of three species of subshrub layer in forest ecosystems of Desnyansko-Starogutsky National Nature Park has been studied: *Calluna vulgaris* (L.) Hull. – in 3 associations, *Vaccinium myrtillus* L. – in 5 associations, *Vaccinium vitis-idaea* L. – in 4 associations. The conclusions on status of cenopopulations have been made based on a sample of 12.321 partial bushes. Monomodal cenopopulations with one population peak prevail among the investigated cenopopulations in forest ecosystems. Cenopopulations of *C. vulgaris* were equally not full-membered, but differed in the nature of age spectra. Coenopopulation of *C. vulgaris* was the youngest one (the aging index of cenopopulation is 0.09 only) in the association of Pinetum callunoso-hylocomiosum. All five populations of *V. myrtillus* with the different aging indices had the similar indices of

generativity at the level of 41–54 %. All of the investigated cenopopulations of cowberries were not full-membered, monomodal, but peaks of the age spectra were in different areas because of different age of populations of *V. vitis-idaea*. The vast majority of coenopopulations of clone forming plants of grass and subshrub layer have turned out to be the centered ones with the population peak, which accounts for generative species.

Key words: plant cenopopulations, ontogenetic pattern, forest ecosystems, ecological and phytocoenotic conditions, generativity and aging of cenopopulations.

Вступ

Північний схід України – це один з заліснених регіонів України, де лісові екосистеми виступають у двох важливих значеннях: центри біорізноманіття та джерела деревини і ряду недеревних ресурсів. Вивчення стану рослинних ресурсів є одним із пріоритетних напрямків ботанічних досліджень. В літературі досить часто зустрічаються результати проведення досліджень онтогенетичної структури ценопопуляцій рослин (Асташенков, 2010; Климишин, Слободян, 1983; Тимошок, Паршина, 1992). Разом з тим автори обмежуються, зазвичай, констатацією того факту, яка саме онтогенетична структура мала місце, і не розглядають особливості її трансформації. Метою нашої роботи було показати, що онтогенетична структура ценопопуляцій рослин трав'яно-чагарничкового ярусу є мобільною, реагує на зміни середовища проживання під наметом ярусу дерев і може використовуватися як індикатор стану самих ценопопуляцій, а також лісових екосистем в цілому.

Методика

Дослідження проводили в угрупованнях широколистяних лісів на півночі Сумської області на території Національного природного парку (НПП) «Деснянсько-Старогутський». Об'єктами дослідження виступали ізольовані локальні ценопопуляції трьох видів – представників чагарничкового ярусу: *Calluna vulgaris* (L.) Hull., *Vaccinium myrtillus* L., *V. vitis-idaea* L., які є характерними для широко поширених типів лісу в регіоні. Онтогенетичні особливості цих видів вивчалися протягом вегетаційних періодів 2004–2015 років. В роботі застосовувалися загальноприйняті методики проведення популяційних досліджень (Злобин, 2009). Вікові спектри складено на підставі аналізу вибірки з 393 парціальних кущів *Calluna vulgaris* з трьох асоціацій; 7173 парціальних кущів *Vaccinium myrtillus* з п'яти асоціацій; 4755 парціальних кущів *Vaccinium vitis-idaea* з чотирьох асоціацій. Для характеристики онтогенетичного стану ценопопуляцій досліджуваних видів використовували онтогенетичні індекси – старіння ($I_{\text{стар.}}$), генеративності ($I_{\text{генер.}}$), віковості ($I_{\text{віков.}}$), відновлення ($I_{\text{віднов.}}$) (Коваленко, 2005). Аналіз змін онтогенетичної структури досліджених ценопопуляцій проводили із урахуванням даних стосовно особливостей еколого-фітоценотичних умов місцезростань.

Фітоценотичну характеристику рослинних угруповань, де були виявлені ценопопуляції (табл. 1), складено на основі більше ніж 50 особистих геоботанічних описів та літературних даних (Панченко, 2013; Соломаха, 2008). Для виявлення екологічних особливостей угруповань (табл. 2) були використані екологічні шкали Я.П.Дідуха (Didukh, 2011). На підставі фітоіндикації визначали наступні режими едафотопу – водний (Hd); кислотний (Rc); азотний (Nt); аерації (Ae), а також такі режими кліматопу, як терморезим (Tm) та освітленість (Lc).

Результати та обговорення

Досліджені рослинні угруповання належать до кількох асоціацій і входять до складу штучних насаджень, що утворилися в результаті відновлення після активного господарського використання. В табл. 1 представлені їх певні фітоценотичні особливості.

Екологічні умови місцезростань, де проводилися дослідження ценопопуляцій, наведені в табл. 2. Всі вони відповідають умовам свіжого лісо-лучного зволоження, приурочені до кислих ґрунтів (pH=4,5–5,5), достатньою мірою аерованих. В найбільш багатих на мінеральний азот місцезростаннях сформувалися угруповання, що належать до асоціацій *Betuleto-Pinetum callunoso-myrtillosum*, *Querceto-Pinetum callunoso-hylocomiosum*, *Pinetum myrtilloso-hylocomiosum*, *Querceto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum*; в найбільш бідніших – угруповання асоціацій *Betuleto-Pinetum molinioso-myrtillosum*, *Pinetum vaccinoso-myrtillosum*, *Betuleto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum*. Інтенсивність освітлення варіювало від 5,1–5,5 балів (асоціації *Pinetum callunoso-hylocomiosum*, *Pinetum myrtilloso-hylocomiosum*, *Querceto-Pinetum myrtillosum*) до 6,0–6,4 (асоціації *Pinetum molinioso-myrtillosum*, *Betuleto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum*, *Pinetum vaccinoso-hylocomiosum*).

Таблиця 1.

Фітоценотичні особливості рослинних угруповань

Назва асоціації	Склад деревостану	Зімкненість деревостану	Середня висота деревостану, м	Середнє проективне покриття домінантів трав'яно-чагарничкового ярусу, %
<i>Calluna vulgaris</i>				
Betuleto-Pinetum callunoso-myrttillosum	8С2Б	0,5	20	30
Pinetum callunoso-hylocomiosum	10С+Б	0,5	21	25
Querceto-Pinetum callunoso-hylocomiosum	9С1Д	0,4	18	35
<i>Vaccinium myrtillus</i>				
Pinetum myrttilloso-hylocomiosum	10С+Д	0,6	25	40
Pinetum molinioso-myrttillosum	10С	0,4	23	60
Querceto-Pinetum myrttillosum	7С3Д	0,7	18	50
Betuletum molinio-myrttillosum	8Б2С	0,5	20	55
Betuleto-Pinetum franguloso-myrttillosum	7С3Б+Д	0,8	21	45
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>				
Pinetum vaccinoso-myrttillosum	10С+Б	0,4	22	40
Betuleto-Pinetum vaccinoso-myrttillosum	6С4Б	0,6	24	45
Querceto-Pinetum vaccinoso-myrttillosum	8С2Д+Б	0,7	25	50
Pinetum vaccinoso-hylocomiosum	9С1Д	0,6	21	40

При співставленні екологічних амплітуд досліджуваних видів (рис. 1) з екологічними умовами фітоценозів виявляється, що оптимальними для всіх видів є водний режим і терморезим. Для *Vaccinium myrtillus* критичними показниками є кислотність ґрунту (більше потреби) і недостатня аерованість. Для *Calluna vulgaris* – занадто кислі ґрунти і занизька освітленість фітоценозу. Ценопопуляції *Vaccinium vitis-idaea* майже за всіма параметрами знаходяться в оптимальних умовах, за виключенням занадто високої освітленості.

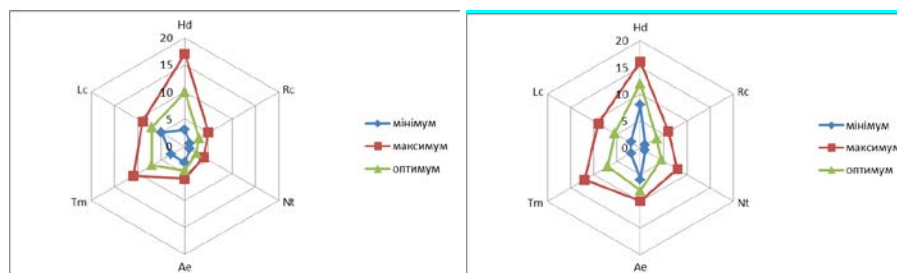
Тривалість повного онтогенезу *Calluna vulgaris* (L.) Hull., як і всіх представників Ericaceae, важко піддається визначенню, оскільки протягом життєвого циклу за рахунок вегетативного розмноження відбувається постійне омолодження парціальних кущів. У онтогенезі вересу виділяють чотири основні фази – латентний період, передгенеративний, генеративний, післягенеративний (Gimingham, Gilliam, 1972). Детальніша періодизація життєвого циклу вересу вперше була виконана Ю.А.Злобіним і М.А.Храмченком (Злобин, Храмченко, 1963), які в його онтогенезі виділили 10 етапів. Як показали наші дослідження, на обстеженій території ценопопуляції *C. vulgaris* були неповночленними (ані проростки, ані субсенільні парціальні кущі не були жодного разу зареєстровані), але відрізнялися за характером вікових спектрів (табл. 4). Парціальні кущі *C. vulgaris*, старші 15 років, вже практично не дають паростків і не підтримують відновлювальний процес у ценопопуляції (Kayll, Gimingham, 1965), тому генеративне розмноження і приживання проростків для ценопопуляцій вересу дуже важливі. Цікаво, що хоча в усіх трьох ценопопуляціях індекс генеративності був високим – на рівні 50–70 %, захоплення території відбувалося лише за рахунок вегетативного розростання.

Таблиця 2.

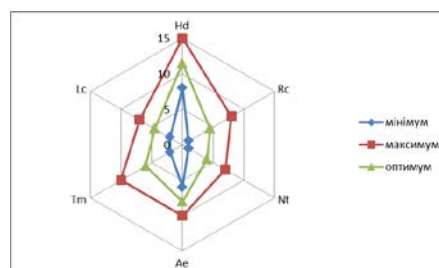
Екологічні особливості рослинних угруповань

Назва асоціації	Фітоіндикаційні показники екологічних режимів*					
	Hd	Rc	Nt	Ae	Tm	Lc
<i>Calluna vulgaris</i>						
Betuleto-Pinetum callunoso-myrtillosum	11,7	6,2	5,0	6,4	7,9	5,8
Pinetum callunoso-hylocomiosum	11,6	5,7	4,8	6,2	7,5	5,5
Querceto-Pinetum callunoso-hylocomiosum	11,8	6,3	5,2	6,2	8,0	5,6
<i>Vaccinium myrtillus</i>						
Pinetum myrtilloso-hylocomiosum	12,3	5,7	5,2	7,0	7,6	5,1
Pinetum molinoso-myrtillosum	12,6	5,7	4,2	6,7	7,5	6,4
Querceto-Pinetum myrtillosum	12,0	5,6	4,8	6,8	7,3	5,3
Betuletum molinio-myrtillosum	12,3	5,6	4,1	6,8	7,8	6,4
Betuleto-Pinetum franguloso-myrtillosum	12,7	5,3	5,0	6,7	7,6	6,1
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>						
Pinetum vaccinoso-myrtillosum	12,0	4,8	4,2	7,5	6,7	5,7
Betuleto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum	12,0	5,1	4,0	7,1	7,1	6,0
Querceto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum	12,0	5,3	5,9	7,3	7,3	5,9
Pinetum vaccinoso-hylocomiosum	12,3	5,0	4,3	7,3	7,0	6,3

Примітка: * – Умовні позначення екологічних режимів наведені в розділі «Методика».



Calluna vulgaris *Vaccinium myrtillus*



Vaccinium vitis-idaea

Рис. 1. Екологічні амплітуди досліджуваних видів

Порівняльний аналіз показує, що онтогенетична структура ценопопуляцій вересу залежить від особливостей середовища існування. Ценопопуляція II знаходиться в стані становлення в сукцесійно молодому лісовому фітоценозі на місці колишніх посадок сосни. Для цієї ценопопуляції властиве швидке розростання, що проявляється в найнижчому індексі віковості (0,09). Лімітуючим фактором для даної ценопопуляції виступає занижка освітленість і досить висока кислотність ґрунту. На відміну від цього, ценопопуляції I і III знаходяться в лісових екосистемах, вік деревостану яких 60–70 років. Ці

ценопопуляції мають високі індекси віковості (1,61–1,72) і пов'язані з кінцевими ланками сукцесійного ряду лісових угруповань. Вони подібні за онтогенетичною структурою та не мають істотних відмінностей в характері середовища існування. Критичними екологічними факторами для них є вміст у ґрунті азоту (вище оптимального рівня) і його кислотність (менш оптимальної). Можна вважати, що через загальний характер лісових фітоценозів регіону верес у них не стане масовим видом в трав'яно-чагарничковому ярусі, але позиція його в них досить міцна, чому сприяє висока засухо- і морозостійкість вересу в сполученні з пластичністю його морфоструктури (Grubb, 1992).

Таблиця 4.
Характеристика ценопопуляцій *Calluna vulgaris* в лісових асоціаціях НПП «Деснянсько-Старогутський»

Ценопопуляції	Кількість парціальних кущів, %									I відно.	I стар.	I генер.	I віков.
	p	j	im	v	g ₁	g ₂	g ₃	ss	s				
I (Betuleto-Pinetum callunoso-myrtillosum)	-	-	6,1	17,3	17,3	21,4	22,4	-	15,3	23,5	37,8	61,2	1,61
II (Pinetum callunoso-hylocomiosum)	-	2,6	17,1	29,1	21,4	25,6	3,4	-	0,9	48,7	4,3	50,4	0,09
III (Querceto-Pinetum callunoso-hylocomiosum)	-	-	6,7	13,5	15,7	29,2	24,7	-	10,1	20,2	34,8	69,7	1,72

Примітки. Для кожної ценопопуляції дослідженого виду наводиться порядковий номер, а в дужках назва рослинного угруповання, до складу якого вона входить. Вікові групи: p – проростки, j – ювенільні, im – іматурні, v – віргінільні, g – генеративні, ss – субсенільні, s – сенільні.

Періодизація онтогенезу *Vaccinium myrtillus* L. вперше виконана Ю.А.Злобіним (1961), але вона була проведена тільки для парціальних кущів вегетативного походження. Як показало наше дослідження, на обстеженій території проростки *V. myrtillus* не були зареєстровані (табл. 5).

Таблиця 5.
Характеристика ценопопуляцій *Vaccinium myrtillus* в лісових асоціаціях НПП «Деснянсько-Старогутський»

Ценопопуляції	Кількість парціальних кущів, %									I відно.	I стар.	I генер.	I віков.
	p	j	im	v	g ₁	g ₂	g ₃	ss	s				
I (Pinetum myrtilloso-hylocomiosum)	-	-	5,4	24,8	10,2	15,9	15,6	23,7	4,4	30,2	43,8	41,7	1,45
II (Pinetum molinioso-myrtillosum)	-	6,7	16,7	20,2	17,5	16,7	13,2	-	9,1	43,6	22,3	47,4	0,51
III (Querceto-Pinetum myrtillosum)	-	6,6	13,1	10,1	15,6	17,6	20,7	16,3	-	29,7	37,1	53,9	1,25
IV (Betuletum molinioso-myrtillosum)	-	6,3	12,6	20,1	18,9	20,1	15,5	6,6	-	38,9	22,0	54,4	0,57
V (Betuleto-Pinetum franguloso-myrtillosum)	-	5,1	13,0	21,5	19,8	19,6	12,8	8,1	-	39,6	20,9	52,3	0,53

Це характерна для чорниці риса, властива їй і в інших частинах ареалу. Вона пов'язана з поїданням ягід чорниці тваринами лісових екосистем і відсутністю у *V. myrtillus* ґрунтового банку насіння (Welch et al., 2000). Плодоносять парціальні кущі 4–7-го літнього віку, але Е.А.Мазною (Мазная, Лянгузова, 1999) було встановлено, наприклад, що життєздатні насінини чорниці не проростають у темряві, до того ж вимагають тривалої холодної стратифікації. Значно знижується плодоносіння *V. myrtillus* й при сполученні теплої зими з холодною весною (Selas, 2000).

Всі п'ять досліджених ценопопуляцій *V. myrtillus* при різній їх віковості мали подібні індекси генеративності, які знаходяться на рівні 41–54 %. Переважали генеративні парціальні кущі. В той же час в тайговій зоні в ценопопуляціях чорниці, як правило, переважають ювенільні та віргінільні

особини. Найвищий індекс відновлювання був зареєстрований нами для ценопопуляції *V. myrtillus* в асоціації *Pinetum molinoso-myrtillosum*, що відповідає твердженню Б.Мошинської (Moszińska, 1985) про те, що екологічний оптимум чорниці лежить в лісах із молінією. За даними фітоіндикації це достатньо аеровані свіжі ліси з кислими ґрунтами.

Аналіз онтогенетичних спектрів *V. myrtillus* показав, що ценопопуляції II, IV, V подібні між собою, а саме мають низький індекс віковості (0,51–0,57). Це, безумовно, як і у випадку з вересом, пов'язано з сукцесійним віком лісових екосистем, в яких деревостан має вік не більше 30–35 років. На їх сукцесійну молодість вказує і наявність берези. Онтогенетичні спектри досліджених ценопопуляцій подібні. Разом з тим, ценопопуляція II знаходиться на найпочатковій фазі становлення: у неї не тільки найнижчий індекс віковості, але і найнижчий індекс генеративності (47,4). На відміну від розглянутих вище, ценопопуляції I і III мають найвищий індекс віковості (1,25–1,45) і пов'язані зі старими лісовими екосистемами з віком деревостану понад 60 років. Ґрунти таких місцезростань мають найбільш високий вміст азоту (4,8–5,2). Критичним екологічним фактором для розвитку ценопопуляції чорниці є кислотність ґрунту (вона відхиляється від оптимуму на 16,9–16,2 %).

При антропогенних впливах на ліс у ценопопуляціях *V. myrtillus* знижується число генеративних парціальних кущів у два рази, і кущі стають дрібнішими (Астрологова, 1989). У Карпатах ценопопуляції чорниці в основному нормального типу, одновершинні з піком на віргінільних особинах. При антропогенних навантаженнях у ценопопуляціях пік з віргінільних особин зміщувався на сенільні. У цих умовах зростала роль вегетативного розмноження. У альпійському поясі Карпат ценопопуляції молоді, неповночленні, генеративне розмноження майже відсутнє (Слободян, 1984). У південно-тайгових лісах до 50% парціальних кущів у ценопопуляціях чорниці знаходяться в передгенеративному стані. Зазнає змін онтогенетичний склад ценопопуляції чорниці й під впливом випасання (Царик, 1984). Онтогенетичний склад ценопопуляцій *V. myrtillus* взагалі дуже пластичний. Це призводить до того, що навіть на північній межі ареалу ценопопуляції досить стійкі, хоча в них переважають вегетативні й сенільні рослини (Деева, 1990).

Періодизація онтогенезу *Vaccinium vitis-idaea* L. вперше була запропонована І.Г.Серебряковим і М.Б.Чернишовою (Серебряков, Чернышова, 1955). Дослідженням онтогенезу цього виду також займався Е.Е.Тимошок (Тимошок, Паршина, 1992). В основних типах лісу південної тайги за даними Н.Ю.Чиркової і Т.Л.Егошиної (Чиркова, Егошина, 2007) у брусниці базовий онтогенетичний спектр неповночленний, двовершинний, в якому максимуми припадають на віргінільні й субсенільні особини. Під час наших досліджень на території НПП «Деснянсько-Старогутський» в ценопопуляціях брусниці проростки та ювенільні рослини виявлені не були, також були відсутні сенільні парціальні кущі. Всі чотири ценопопуляції брусниці є неповночленними, моноmodalними, але піки вікових спектрів знаходились в різній зоні через неоднаковий вік ценопопуляцій *V. vitis-idaea*. Індекс генеративності був найнижчим у наймолодшій ценопопуляції і підвищувався із збільшенням віковості. Зазвичай оптимум плодоношення брусниці пов'язаний із сосняками-брусничниками (Козюк, 1999).

Таблиця 6.

Характеристика ценопопуляцій *Vaccinium vitis-idaea* в лісових асоціаціях НПП «Деснянсько-Старогутський»

Ценопопуляції	Кількість парціальних кущів, %									I віднов.	I стар.	I генер.	I віков.
	p	j	im	v	g ₁	g ₂	g ₃	ss	s				
I (<i>Pinetum vaccinoso-myrtillosum</i>)	-	-	14,0	20,1	22,2	14,8	19,9	8,2	-	34,9	28,1	56,9	0,81
II (<i>Betuleto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum</i>)	-	-	9,3	20,1	30,4	30,3	7,8	1,9	-	29,4	9,9	68,7	0,34
III (<i>Querceto-Pinetum vaccinoso-myrtillosum</i>)	-	-	23,0	26,9	20,9	19,2	9,9	0,1	-	49,9	10,0	49,9	0,20
IV (<i>Pinetum vaccinoso-hylocomiosum</i>)	-	-	5,8	10,5	18,2	26,2	20,2	19,2	-	16,3	39,3	64,5	2,41

Ценопопуляції *V. vitis-idaea* I, II, III пов'язані з молодими лісовими фітоценозами, вік деревостану в яких не перевищує 30–40 років. Відповідно, їм притаманний найнижчий індекс віковості (0,2–0,81) (табл. 6). На відміну від цього ценопопуляція IV має індекс віковості майже в 3 рази вищий (2,41). Вона

розвивається в рослинному угрупованні, що характеризується стиглим деревостаном. Про зміни структури ценопопуляцій брусниці через сукцесійно-вікові зміни деревостану раніше вже йшлося в літературі (Бурдюнене, 1987). Разом з тим в клімаксових угрупованнях південної Карелії онтогенетичний склад ценопопуляцій різних місцезростань стабільний при середньому віці парціальних кущів у 2,2–2,9 роки (Пааль, Пааль, 1989).

Деякі відмінності в онтогенетичних спектрах ценопопуляцій I–III відображають різну кислотність ґрунту (від 4,8 до 5,3). Неоптимальна кислотність порушує поглинання мінеральних речовин з ґрунту, що веде до зниження життєвого стану рослин, зміни темпів проходження етапів онтогенезу і, відповідно, структури популяцій. Крім того, ценопопуляція III приурочена до лісового масиву з більш високим вмістом азоту в ґрунті (5,9).

У цілому, більшість досліджених ценопопуляцій клоноутворюючих рослин трав'яно-чагарничкового ярусу лісових угруповань НПП «Деснянсько-Старогутський» можна віднести до молодих, лише деякі – перехідні (для них характерні найвищі значення індексу старіння). Певна однорідність вікового складу ценопопуляцій визначається самою природою онтогенетичних спектрів. Це визнавалося і представниками московської демографічної школи: Л.Б.Заугольнова (1987, с. 23) писала, що «у віковому розвитку більшості видів рослин не виявляється будь-якого чіткого зв'язку зі змінами зовнішніх умов: у більшості випадків перехід у наступний віковий стан пов'язаний із здійсненням генетично закріпленої програми індивідуального розвитку». Про оборотні зміни онтогенетичних спектрів (повернення ценопопуляції до вихідного стану) рослин Карпат писали також В.Г.Кияк, Ю.І.Кобнев та Н.І.Сварнях (1991). У сформованих угрупованнях, як правило, ценопопуляції рослин мають інвазійну або нормальну структуру і часто неповночленні. Це спостерігається не лише в лісах, але й в інших типах фітоценозів (Вахрушева, Мишнев, 1988; Жилияев, 1987; Кияк, 1985; Коржинский, 1987; Малиновський, Царик, 1991; Каплан, Полякова, 1998). Стабільність онтогенетичного спектру – кращий показник адаптованості ценопопуляції до даних умов зростання (Климишин, Слободян, 1983).

Висновок

Серед вивчених 12-ти ценопопуляцій клоноутворюючих рослин трав'яно-чагарничкового ярусу лісових екосистемах НПП «Деснянсько-Старогутський» переважають мономодальні з одним піком чисельності (за винятком двох ценопопуляцій *V. myrtillus*). Для переважної більшості ценопопуляцій пік чисельності припадає на парціальні кущі генеративної вікової групи. Певна частина ценопопуляцій (37% від загальної кількості) характеризується лівосторонніми спектрами з домінуванням парціальних кущів передгенеративного стану. Особливістю досліджених лісових фітоценозів є відсутність ценопопуляцій із правосторонніми спектрами, з переважанням субсенільних і сенільних рослин. Відповідно до класифікації Т.А.Работнова (Работнов, 1951) 58% досліджених ценопопуляцій можна вважати інвазійними, а 42% – нормальними. Для ценопопуляцій *S. vulgaris* критичними факторами виступають кислотність і вміст азоту в ґрунті, а також низька освітленість. Критичним екологічним фактором для ценопопуляцій *V. myrtillus* є кислотність ґрунту, найбільші розбіжності між оптимальними і реальними показниками зафіксовані в ценопопуляціях №1 і 3 з асоціацій *Pinetum myrtilloso-hylocomiosum* і *Querceto-Pinetum myrtillosum*. Для *V. vitis-idaea* критичним фактором також виступає висока кислотність ґрунту, яка негативно впливає на життєвий стан рослин і популяцій в цілому.

Список літератури

- Асташенков А.Ю. Онтогенетическая структура и оценка состояния ценопопуляций в Забайкалье // Раст. мир. Азиат. Росс. – 2010. – №1 (5). – С. 66–72. /Astashenkov A.Yu. Ontogeneticheskaya struktura i otsenka sostoyaniya tsenopopulyatsiy v Zabaykal'ye // Rast. mir. Aziat. Ross. – 2010. – №1 (5). – S. 66–72./
- Астрологова Л.Е. Сравнительный анализ структуры ценопопуляций черники в сосняках-черничниках Архангельской области // Тез. докл. 7-го совещ. по классиф. растит. – Минск, 1989. – С.7. /Astrologova L.Ye. Sravnitel'nyy analiz struktury tsenopopulyatsiy cherniki v sosnyakakh-chernichnikakh Arkhangel'skoy oblasti // Tez. dokl. 7-go soveshch. po klassif. rastit. – Minsk, 1989. – S.7./
- Бурдюнене Д.К. Динамика ценопопуляций *Vaccinium vitis-idaea* при сменах сосняков брусничных и бруснично-черничных в Литовской ССР // Растительные ресурсы. – 1987. – Т.23, №2. – С. 196–203. /Burdynene D.K. Dinamika tsenopopulyatsiy Vaccinium vitis-idaea pri smenakh sosnyakov brusnichnykh i brusnichno-chernichnykh v Litovskoy SSR // Rastitel'nye resursy. – 1987. – T.23, №2. – S. 196–203./

- Вахрушева Л.П., Мишнев В.Г. Возрастной состав ценопопуляций доминирующих видов травяного покрова дубравы // Изучение экосистем Крыма в природоохранном аспекте. – К., 1988. – С. 26–34. /Vakhrusheva L.P., Mishnev V.G. Vozrastnoy sostav tsenopopulyatsiy dominiruyushchikh vidov travyanogo pokrova dubravy // Izucheniye ekosistem Kryma v prirodookhrannom aspekte. – K., 1988. – S. 26–34./
- Деева Н.М. Устойчивость ценопопуляций черники у северной границы ареала вида // Проблемы устойчивых биологических систем. – Х., 1990. – С. 272–274. /Deyeva N.M. Ustoychivost' tsenopopulyatsiy cherniki u severnoy granitsy areala vida // Problemy ustoychivyykh biologicheskikh sistem. – Kh., 1990. – S. 272–274./
- Жиляев Г.Г. Динамика популяций растений в сообществах субальпийского и альпийского поясов Карпат // Динамика ценопопуляций травянистых растений. – К.: Наукова думка, 1987. – С. 42–52. /Zhilyayev G.G. Dinamika populyatsiy rasteniy v soobshchestvakh subal'piyskogo i al'piyskogo pojasov Karpat // Dinamika tsenopopulyatsiy travyanistykh rasteniy. – K.: Naukova dumka, 1987. – S. 42–52./
- Заугольнова Л.Б. Соотношение эндогенных и экзогенных факторов в динамике ценопопуляций семенных растений // Динамика ценопопуляций травянистых растений. – К.: Наукова думка, 1987. – С. 19–25. /Zaugol'nova L.B. Sootnosheniye endogennykh i ekzogenykh faktorov v dinamike tsenopopulyatsiy semennykh rasteniy // Dinamika tsenopopulyatsiy travyanistykh rasteniy. – K.: Naukova dumka, 1987. – S. 19–25./
- Злобин Ю.А. К познанию строения клонов *Vaccinium myrtillus* L. // Ботан. журн. – 1961. – №3. – С. 414–419. /Zlobin Yu.A. K poznaniyu stroeniya klonov *Vaccinium myrtillus* L. // Botan. zhurn. – 1961. – №3. – S. 414–419./
- Злобин Ю.А., Храмченко Н.А. Некоторые эколого-фитоценотические особенности обыкновенного вереска (*Calluna vulgaris* Hill.) на восточной границе ареала // Биологические науки. – 1963. – №3. – С. 125–130. /Zlobin Yu.A., Khramchenko N.A. Nekotoryye ekologo-fitotsenoticheskiye osobennosti obyknovennogo vereska (*Calluna vulgaris* Hill.) na vostochnoy granitse areala // Biologicheskije nauki. – 1963. – №3. – S. 125–130./
- Злобин Ю.А. Популяционная экология растений: современное состояние, точки роста. – Сумы: Унив. книга, 2009. – 263с. /Zlobin Yu.A. Populyatsionnaya ekologiya rasteniy: sovremennoye sostoyaniye, tochki rosta. – Sumy: Univ. kniga, 2009. – 263s./
- Каплан Б.М., Полякова Г.А. Сныть обыкновенная в парковых насаждениях // Лесное хозяйство. – 1998. – №4. – С. 31–32. /Kaplan B.M., Polyakova G.A. Snyt' obyknovennaya v parkovykh nasazhdeniyakh // Lesnoe khozyaystvo. – 1998. – №4. – S. 31–32./
- Кияк В.Г., Кобнев Ю.Н., Сварнях Н.И. Особенности возрастной структуры ценопопуляций и онтогенез горных растений Карпат // Экология популяций. – М., 1991. – С. 150–165. /Kiyak V.G., Kobnev Yu.N., Svaryakh N.I. Osobennosti vozrastnoy struktury tsenopopulyatsiy i ontogenez gornykh rasteniy Karpat // Ekologiya populyatsiy. – M., 1991. – S. 150–165./
- Кияк В.Г. Структура популяций рослин в угрупованні *Seslerietum caricetofe-stucosum* в Українських Карпатах // Український ботанічний журнал. – 1985. – Т.42, №3. – С. 10–13. /Kyak V.G. Struktura populyatsiy roslyn v ugrupovanni *Seslerietum caricetofe-stucosum* v Ukrain's'kykh Karpatakh // Ukrain's'ky botanichnyy zhurnal. – 1985. – T.42, №3. – S. 10–13./
- Климишин О.С., Слободян Г.М. Щільність і віковий склад фітоценопопуляцій карпатських чорничників // Український ботанічний журнал. – 1983. – Т.40, №1. – С. 39–42. /Klymyshyn O.S., Slobodyan G.M. Shchil'nist' i vikovy sklad fitotsenopopulyatsiy karpats'kykh chornychnykiv // Ukrain's'ky botanichnyy zhurnal. – 1983. – T.40, №1. – S. 39–42./
- Коваленко І.М. Структура популяцій домінантів трав'яно-чагарничкового ярусу лісових фітоценозів Деснянсько-Старогутського національного природного парку. Онтогенетична структура // Укр. ботан. журн. – 2005. – Т.62, №5. – С. 707–715. /Kovalenko I.M. Struktura populyatsiy dominantiv trav'yano-chagarnychkovogo yarusu lisovykh fitotsenoziv Desnyans'ko-Staroguts'kogo natsional'nogo pryrodnogo parku. Ontogenetychna struktura // Ukr. botan. zhurn. – 2005. – T.62, №5. – S. 707–715./
- Козюк В.П. Фіторесурси *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae) Волинського Полісся // Український ботанічний журнал. – 1999. – Т.56, №6. – С. 629–634. /Kozyuk V.P. Fitoresursy *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae) Volyn's'kogo Polissya // Ukrain's'ky botanichnyy zhurnal. – 1999. – T.56, №6. – S. 629–634./
- Коржинский Я.В. Структура ценопопуляций растений в луговичнике разнотравном // Динамика ценопопуляций травянистых растений. – К.: Наукова думка, 1987. – С. 87–92. /Korzhinskiy Ya.V. Struktura tsenopopulyatsiy rasteniy v lugovichnike raznotravnom // Dinamika tsenopopulyatsiy travyanistykh rasteniy. – K.: Naukova dumka, 1987. – S. 87–92./
- Мазная Е.А., Лянгузова И.В. Биология прорастания семян некоторых видов рода *Vaccinium* L. // Растительные ресурсы. – 1999. – Т.35, №1. – С. 53–60. /Maznaya Ye.A., Lyanguzova I.V. Biologiya prorastaniya semyan nekotorykh vidov roda *Vaccinium* L. // Rastitel'nyye resursy. – 1999. – T.35, №1. – S. 53–60./
- Малиновський К.А., Царик Й.В. Структура популяцій рослин у Карпатах // Український ботанічний журнал. – 1991. – Т.48, №6. – С. 82–87. /Malynovs'ky K.A., Tsaryk Y.V. Struktura populyatsiy roslyn u Karpatakh // Ukrain's'ky botanichnyy zhurnal. – 1991. – T.48, №6. – S. 82–87./
- Пааль Т., Пааль Я. Структура ценопопуляций *Vaccinium vitis-idaea* L. – Таллин: Валгус, 1989. – 212с. /Paal' T., Paal' Ya. Struktura tsenopopulyatsiy *Vaccinium vitis-idaea* L. – Tallin: Valgus, 1989. – 212s./

- Панченко С.М. Лесная растительность национального природного парка «Деснянско-Старогутский». – Сумы: Университетская книга, 2013. – 312с. /Panchenko S.M. Lesnaya rastitel'nost' natsional'nogo pryrodnogo parka «Desnyansko-Starogutskyy». – Sumy: Universitetskaya kniga, 2013. – 312s./
- Работнов Т.А. К методике наблюдения над травянистыми растениями на постоянных площадках // Ботанический журнал. – 1951. – Т.36, №6. – С. 450–457. /Rabotnov T.A. K metodike nablyudeniya nad travyanistymi rasteniyami na postoyannykh ploshchadkakh // Botanicheskiy zhurnal. – 1951. – Т.36, №6. – С. 450–457./
- Серебряков И.Г., Чернышова М.Б. О морфогенезе жизненной формы кустарничка у черники, брусники и некоторых болотных Ericaceae // Бюлл. МОИП. (Отд. биол.). – 1955. – Т.60, №4. – С. 65–77. /Serebryakov I.G., Chernyshova M.B. O morfogeneze zhiznennoy formy kustarnichka u cherniki, brusniki i nekotorykh bolotnykh Ericaceae // Byull. MOIP. (Otd. biol.). – 1955. – Т.60, №4. – С. 65–77./
- Слободян Г.М. Сравнительная характеристика структуры ценопопуляций черники в первичных и вторичных биогеоценозах Карпат // Сб. «Биогеоцен. исслед. на Украине». – Львов, 1984. – С. 136–137. /Slobodyan G.M. Sravnitel'naya kharakteristika struktury tsenopopulyatsiy cherniki v pervichnykh i vtorichnykh biogeotsenozakh Karpat // Sb. «Biogeotsen. issled. na Ukraine». – L'vov, 1984. – С. 136–137./
- Соломаха В.А. Синтаксономія рослинності України. – К.: Фітосоціоцентр, 2008. – 296с. /Solomakha V.A. Syntaksonomiya roslynnosti Ukrainy. – K.: Fitosotsiotsentr, 2008. – 296s./
- Тимошок Е.Е., Паршина Н.В. Возрастная структура *Vaccinium vitis-idaea* L. в Западной Сибири // Раст. ресурсы. – 1992. – №3. – С. 1–14. /Timoshok Ye.Ye., Parshina N.V. Vozrastnaya struktura *Vaccinium vitis-idaea* L. v Zapadnoy Sibiri // Rast. resursy. – 1992. – №3. – С. 1–14./
- Царик И.В. Влияние выпасания на ценопопуляционную структуру чагарничково-травяного яруса *Piceetum myrtillosum* // Укр. ботан. журн. – 1984. – Т.41, №6. – С. 28–33. /Tsaryk I.V. Vplyv vyvasannya na tsenopopulyatsiynnu strukturu chagarnychkovo-trav'yanogo yarusu *Piceetum myrtillosum* // Ukr. botan. zhurn. – 1984. – Т.41, №6. – С. 28–33./
- Чиркова Н.Ю., Егошина Т.Л. Демографические характеристики популяций *Vaccinium vitis-idaea* L. в условиях южнотаежных лесов Кировской области // Вестн. ОГУ. – 2007. – №12. – С. 96–101. /Chirkova N.Yu., Yegoshina T.L. Demograficheskiye kharakteristiki populyatsiy *Vaccinium vitis-idaea* L. v usloviyakh yuzhnotayezhnykh lesov Kirovskoy oblasti // Vestn. OGU. – 2007. – №12. – С. 96–101./
- Didukh Ya.P. The ecological scales for the species of Ukrainian flora and their use in synphytoindication. – Kyiv: Phytosociocentre, 2011. – 176p.
- Gimingham C.H., Gilliam F.S. Ecology of heathland. – L.: Chapman Hall, 1972. – 266p.
- Grubb P.J. A positive distrust in simplicity – lessons from plant defences and from competition among plants and animals // J. Ecol. – 1992. – Vol.80, no.4. – P. 585–610.
- Kayll A.J., Gimingham C.H. Vegetative regeneration of *Calluna vulgaris* after fire // J. Ecol. – 1965. – Vol.53, no.3. – P. 127–134.
- Moszińska B. Some problems on ecology of *Vaccinium myrtillus* L. in pine forest communities // Pol. Ecol. Stud. – 1985. – Vol.9, no.4. – P. 565–643.
- Selas V. Seed production of masting dwarf shrub, *Vaccinium myrtillus* in relation to previous reproduction and weather // Can. j. Bot. – 2000. – Vol.78, no.4. – P. 423–429.
- Welch D., Scott D., Dogle S. Studies on the paradox of seedling rarity in *Vaccinium myrtillus* L. in NE Scotland // Bot. j. Scott. – 2000. – Vol.52, no.1. – P. 17–30.

Представлено: А.П.Вакал / Presented by: A.P.Vakal
Рецензент: О.В.Безроднова / Reviewer: O.V.Bezrodnova
Подано до редакції / Received: 18.07.2015

УДК: 616-022.8:581.49

Особливості перебігу палінації представників роду *Betula L.* у Івано-Франківську впродовж 2013–2015 років Г.М.Мельниченко

*Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника (Івано-Франківськ, Україна)
gdutchak@mail.ru*

У статті представлені результати аеропалінологічного дослідження в Івано-Франківську впродовж 2013–2015 років. Виявлені особливості кількісної динаміки пилку видів роду *Betula* у повітрі міста. Проаналізовано вплив ключових метеорологічних чинників на перебіг палінації. Встановлено, що найбільш інтенсивно палінація проходить при температурі від +10 до +19°C та вологості 58–70 %, середня тривалість пилкового сезону становить 25 днів. Показано значний вплив напряму переважаючих вітрів та середньодобової температури на формування аеропалінологічної ситуації у місті. Виявлено початок та кінець пилення, а також дні, коли концентрація пилку була найвищою.

Ключові слова: пилкові зерна, сезон пилення, метеорологічні показники, *Betula*, Івано-Франківськ.

Особенности протекания палинации представителей рода *Betula L.* в Ивано-Франковске в течение 2013–2015 годов Г.М.Мельниченко

В статье представлены результаты аеропалинологического исследования в Ивано-Франковске в течение 2013–2015 годов. Виявлены особенности количественной динамики пыльцы видов рода *Betula* в воздухе города. Проанализировано влияние ключевых метеорологических факторов на протекание палинации. Установлено, что наиболее интенсивно палинация проходит при температуре от +10 до +19°C и влажности 58–70 %, средняя продолжительность пыльцевого сезона составляет 25 дней. Показано значительное влияние направления преобладающих ветров и среднесуточной температуры на формирование аеропалинологической ситуации в городе. Виявлены начало и конец пыления, а также дни, когда концентрация пыльцы была самой высокой.

Ключевые слова: пыльца, сезон пыления, метеорологические параметры, *Betula*, Ивано-Франковск.

Features of the course of pollination of the genus *Betula L.* in Ivano-Frankivsk during the period of 2013–2015 G.M.Melnichenko

The article presents the data of aeropalynological research in Ivano-Frankivsk during the period of 2013–2015 years. The features of quantitative dynamics of pollen of *Betula* species have been revealed in the air of the city. The influence of key meteorological factors on the course of pollination of the genus *Betula* has been analyzed. It has been established that the most intense pollination takes place at the temperature from +10 to +19°C and humidity of 58–70 %, the average duration of pollen season is 25 days. The data show a significant effect of predominant wind directions and average temperature on the development of the aeropalynological situation in the city. The beginning and end of pollination were found and days when the pollen concentration was the highest.

Key words: pollen grains, pollen season, meteorological conditions, *Betula*, Ivano-Frankivsk.

Вступ

Відомо, що пилок, особливо анемофільних рослин, є причиною виникнення алергічних захворювань – полінозів. Аеропалінологічні дослідження сприяють виявленню закономірностей перебігу пилення алергенних рослин, а отримані результати слугують інформаційною основою для профілактики полінозів. В багатьох країнах світу (США, Канаді, Австрії, Фінляндії, Швеції, Іспанії, Італії, Німеччині, Австрії, Великобританії, Польщі) створені національні мережі пилкового моніторингу. В Іспанії функціонує 47 пунктів спостереження, в Італії – 44, у Франції – 70, у Німеччині – 45. Їхньою метою є дослідження якісної та кількісної динаміки пилку та спор грибів в атмосферному повітрі та інформування населення за допомогою засобів масової інформації і спеціально-створених інтернет-

сайтів (www.polleninfo.org). Європейська аероалергенна мережа (European Aeroallergen Network), метою якої є здійсненняпилкового аеромоніторингу, наразі включає понад 600 пунктів спостереження (Jager et al., 2012).

В Україні багаторічні аеропалінологічні дослідження проводяться в чотирьох містах – Вінниці, Запоріжжі, Львові та Києві, два перших міста включені до Європейської Аероалергенної мережі (Воробець, Калинович, 2012). Пункти аеропалінологічного моніторингу Вінниці, Запоріжжя та Києва обладнані сучасним пилковловлювачем типу Буркард. Дослідження спрямовані на встановлення якісного складу пилкового опад, кількісної динаміки алергенного пилку, впливу метеорологічних факторів на його вміст у повітрі. Наразі у Вінниці на основі багаторічних спостережень здійснюється моделювання та прогнозування аероалергенної ситуації. З травня 2011 року розпочав свою роботу безкоштовний соціальний сервіс з розповсюдження пилкових прогнозів для схильних до сезонної алергії людей (Melnichenko, Mylenka, 2014). У Львові аеропалінологічний моніторинг проводиться гравіметричним методом, за допомогою пилковловлювача Дюрама. Здійснюються спостереження за динамікою концентрації пилку чотирнадцяти таксонів. Результати досліджень оприлюднюються у вітчизняних та закордонних виданнях (Воробець, Калинович, 2012). Суттєвою перепорою у створенні мережі аеропалінологічного моніторингу в Україні є те, що його проведення не закріплено на законодавчому рівні, а дослідження якісної та кількісної динаміки пилку здійснюється виключно науково-освітніми установами без будь-якого сприяння держави.

У Івано-Франківську аеропалінологічні дослідження раніше не проводилися. Вперше пилковий моніторинг було започатковано у 2013 році М.М.Миленькою на базі Інституту природничих наук Прикарпатського національного університету ім. В.Стефаника. Наразі напрямками досліджень є вивчення аеропалінологічного спектру міста, внеску представників різних таксонів у його формування, кількісної динаміки алергенного пилку у повітрі.

Пилок представників роду *Betula* L. є одним із найважливіших аероалергенів Північної та Центральної Європи. Його алергенність за п'ятибальною шкалою оцінюється найвищим балом (Allergenic pollen..., 2013; Sulmont, 2008). Пилок берез займає чільне місце в аеропалінологічному спектрі міста, зокрема у 2013 році його внесок у пилковий опад становив 5,3% (4363 пилкових зерен (п.з.)), у 2014 – 33,1% (29074 п.з.), а у 2015 – 14,5% (15540 п.з.). Тому метою нашої роботи було дослідження кількісної динаміки алергенного пилку представників роду *Betula* у повітрі Івано-Франківська за 2013–2015 роки. Необхідно було встановити початок, максимум, кінець пилення, його тривалість, оцінити інтенсивність палінації, виявити вплив метеорологічних факторів на концентрацію пилкових зерен у повітрі міста.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були пилкові зерна видів роду *Betula*, які вільно розповсюджувалися в повітрі міста в період цвітіння представників зазначеного таксону впродовж 2013–2015 років.

Аеропалінологічний моніторинг проводили гравіметричним методом за допомогою пилковловлювача Дюрама, який був встановлений на даху Інституту природничих наук на висоті 24 м від поверхні землі. Пилкові зерна пасивно осідали на змащене гліцерином предметне скельце. Скельця змінювали щодоби. Для виготовлення постійних мікроскопічних препаратів використовували гліцерин-желатинову суміш з барвником сафраніном (Мейер-Меликян и др., 1999). Підрахунок пилкових зерен проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus CX-300 (збільшення 400x) неперервними вертикальними трансектами. Ідентифікацію пилку і встановлення його родової приналежності здійснювали з використанням визначників та еталонних препаратів (www.polleninfo.org).

Для кількісного аналізу дані щодо кількості пилкових зерен на 1 см² предметного скельця трансформували в кількість пилкових зерен в 1 м³ повітря (п.з./м³) (Bassett et al., 1978). Тривалість палінаційного періоду визначали методом «95%», згідно якого сезон палінації рослини починається того дня, коли кількість її пилку в повітрі становить 2,5% від загальної суми зібраних упродовж сезону пилкових зерен. Закінченням сезону вважали день, коли кількість зібраного за сезон пилку досягає 97,5% (Galan et al., 1995), а також фіксували появу перших та останніх пилкових зерен на препаратах. Пороговою вважали концентрацію пилку >50 п.з./м³ (Allergenic pollen..., 2013; Sulmont, 2008).

Метеорологічні дані були отримані з інтернет-сайту архіву погоди (Архів погоди). Для з'ясування статистичної залежності між ключовими метеорологічними чинниками та концентрацією пилкових

зерен в атмосферному повітрі було проведено кореляційний аналіз. Усі розрахунки і графічна інтерпретація результатів дослідження виконані з використанням редактора MS Excel 2010.

Результати та обговорення

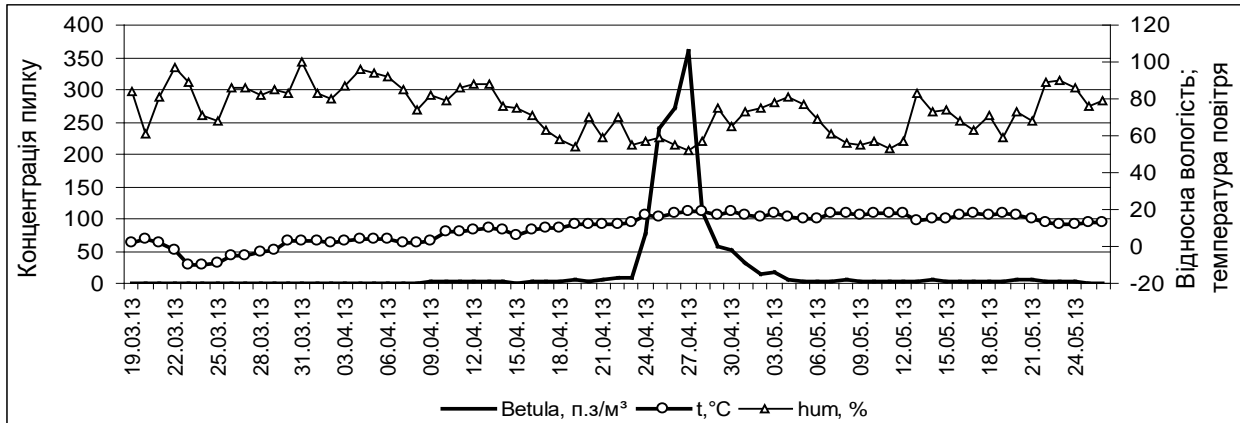
В м. Івано-Франківську та на прилеглих територіях найпоширенішими є такі представники роду *Betula*, як *B. verrucosa* Ehrh. (*B. pendula* Roth.) та *B. pubescens* Ehrh. (*B. alba* L.). Обидва види входять до складу як мішаних, так й монодомінантних насаджень, але перший вид більш широко використовується у міському озелененні (скверах, парках) та для створення лісосмуг. Частота трапляння *B. verrucosa* на території Івано-Франківська становить 3–5 екземплярів на 100 м² (Олійник, Гнезділова, 2009; Лисенко, 2007).

Цвітуть представники досліджуваного роду у квітні-травні (Мінарченко, Тимченко, 2002). За результатами наших трирічних аеропалінологічних спостережень тривалість пилкового сезону (за методом «95%») в середньому становила 25 днів. Початок спостерігали у другій декаді квітня, кінець припадав на першу-другу декаду травня. Винятком був 2014 рік, коли сезон пилення розпочався на дві декади раніше, наприкінці березня, а завершився вже наприкінці квітня. Саме в цей рік палінація була найінтенсивнішою. Високі концентрації пилку констатували впродовж усього пилкового сезону. Спостерігали два виражені піки – 31.03 (1934 п.з./м³) та 03.04 (1487 п.з./м³), що, ймовірно, було пов'язано з вітровим режимом. Саме 31.03 переважав південно-західний напрям вітру, а наступного дня він змінився на північно-західний та північний, при цьому спостерігали різке зниження концентрації пилку до 229 п.з./м³, при незмінній середньодобовій температурі та відносній вологості. Аналогічна ситуація зареєстрована під час другого піку палінації, напередодні якого (02.04) переважали північно-східний та східний напрями вітрів, а 03.03 змінилися на південно-східний. У 2013 та 2015 роках найінтенсивнішим було пилення берези з початку третьої декади і до кінця квітня із одним піком в середині третьої декади квітня.

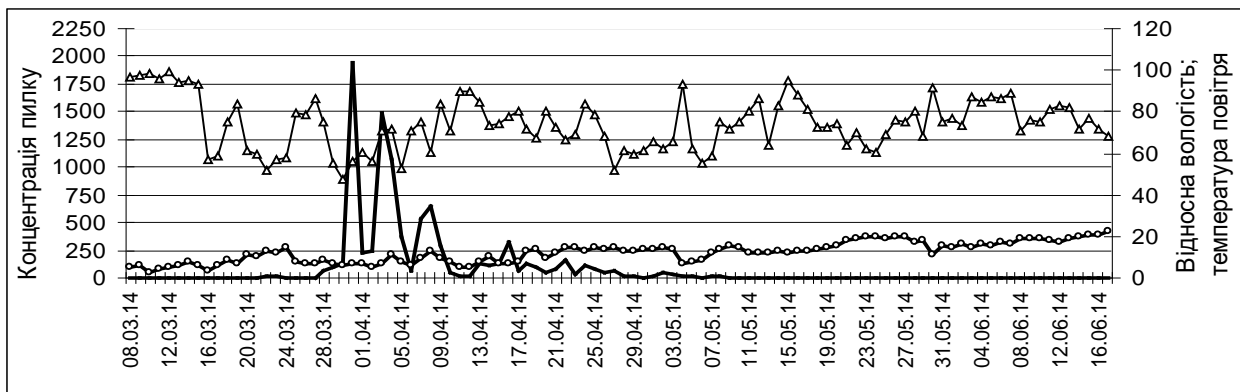
Результати дослідження у Львові (Волощук, 2014) свідчать про пізнішу появу пилку берез у повітрі міста, а саме на початку квітня (тоді як у Івано-Франківську він з'являється у першій-другій декадах березня), і його наявність аж до середини червня (у Івано-Франківську пилко наявний у повітрі тільки до початку червня). Піки пилення співпадають (у третій декаді квітня). За результатами аеропалінологічних досліджень у Вінниці пилко берез теж є найбільш поширеним поміж інших деревних у пилковому опаді міста. Середня тривалість палінаційного періоду співпадає з тривалістю в Івано-Франківську (24 дні), початок пилкового сезону спостерігають у першій декаді квітня, а кінець – на початку травня. Пік пилення, як і в Івано-Франківську, припадає на третю декаду квітня (Родінкова, 2012). У Запоріжжі внесок пилку берези у річний аеропаліноспектр є у п'ять разів менший, ніж в Івано-Франківську, і становить в середньому 3,6%. Пилковий сезон розпочинається на декаду раніше (у першій декаді квітня) і закінчується у другій декаді травня. Його тривалість становить 33 дні, а пік пилення припадає на другу декаду квітня (Приходько та ін., 2010). Подібно до Івано-Франківська початок пилкового сезону берез у Польщі також спостерігається у квітні: у першій декаді – у Щеціні (Puc, 2006) та Кракові (Myszkowska, Piotrowicz, 2009), в другій – у Жешуві (Kasprzyk, 2008) та Любліні (Piotrowska-Weryszko, Weryszko-Chmielewska, 2014). Максимальні концентрації зафіксовано у другій половині квітня. У Любліні пилкові зерна берез домінують в аеропалінологічному спектрі міста (23,6%), а в Кракові вони поступаються лише видам родів *Pinus* та *Fraxinus*, частка яких у річному пилковому опаді становить 18 і 31% (Myszkowska, Piotrowicz, 2009; Piotrowska-Weryszko, Weryszko-Chmielewska, 2014).

Пилення рослин відбувається у певний період, що пов'язано з генетично обумовленим біологічним ритмом цвітіння та пилення, але метеорологічні чинники можуть пришвидшити чи сповільнити, подовжити чи скоротити ці процеси. Тому доцільно розглянути детальніше динаміку концентрації пилку в повітрі у взаємозв'язку із метеорологічними факторами по окремих роках. У 2013 році вперше пилко видів роду *Betula* виявлений в атмосферному повітрі міста 19.03, при середньодобовій температурі повітря +2,3°C, відносній вологості 84% і переважанні південно-східного напрямку вітру (рис. 1А). Безперервну появу пилку в повітрі міста констатовано з 06.04 за середньодобової температури +3,8°C і відносної вологості 92,2%. Протягом наступних двох тижнів концентрація пилку була низькою і коливалася від 1 до 5 п.з./м³. Значне підвищення концентрації пилкових зерен берези спостерігали починаючи з 24 квітня (до 78 п.з./м³), при зростанні середньодобової температури повітря до +16,8°C та зниженні відносної вологості повітря до 57,3%. Пік пилення зафіксований 27 квітня (359 п.з./м³), коли середньодобова температура досягла +19°C, а

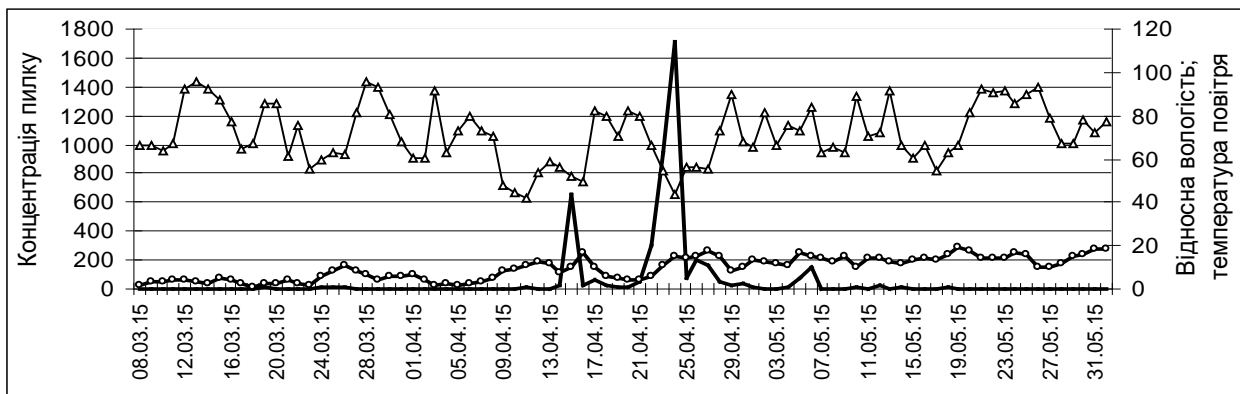
відносна вологість знизилася до 52,3%. З 29 квітня концентрація пилку берез в атмосферному повітрі поступово знижувалась, а поодинокі пилкові зерна спостерігали до 26 травня. Різкі зниження концентрації відмічені після інтенсивних атмосферних опадів, що відповідає законам переміщення дрібнодисперсних часток у повітрі. Пилковий сезон тривав 23 дні (початок – 20.04, кінець – 14.05). Концентрація пилку достовірно позитивно корелювала з температурою атмосферного повітря ($r_{t^{\circ}C} = +0,5366$), зворотно – з відносною атмосферою вологістю ($r_{hum\%} = -0,5209$).



А



Б



В

Рис. 1. Динаміка концентрації пилових зерен представників роду *Betula* у повітрі міста Івано-Франківська за 2013 (А), 2014 (Б) та 2015 (В) роки у співставленні із середньодобовою температурою та відносною вологістю повітря

У 2014 році появу перших пилкових зерен констатовано 08 березня, при середньодобовій температурі $+5,3^{\circ}\text{C}$ та відносній вологості повітря 90,6% (рис. 1Б), що, ймовірно, пов'язано з процесами аеропереносу із суміжних територій (переважав південно-східний напрям вітру). Безперервну появу пилку на препаратах реєстрували з 20.03. Впродовж тижня кількість пилкових зерен була незначною ($1-11$ п.з./ m^3), що пояснюється немасовим цвітінням берез. З 28.03 концентрація пилку у повітрі різко зросла (67 п.з./ m^3) і досягла максимального значення 31.03 (1934 п.з./ m^3), при цьому температура повітря становила $+7^{\circ}\text{C}$, а відносна вологість – 56%, переважав південно-західний напрям вітру. Впродовж квітня кількість пилкових зерен берези в атмосферному повітрі міста залишалася високою (в середньому 220 п.з./ m^3), при коливанні середньодобової температури від $+7^{\circ}\text{C}$ до $+14^{\circ}\text{C}$ та відносної вологості – 53–85 %, за винятком окремих днів (10–12.04, 23.04). Зниження концентрації приурочене до умов підвищеної вологості та атмосферних опадів. З 28.03 по 27.04 констатували перевищення порогової концентрації пилку, а 31.03, 3–4, 7–8.04 кількість пилкових зерен у повітрі в десятки разів перевищувала клінічно значущу. Починаючи з першої декади травня, кількість пилку зменшувалася і в середньому становила 12 п.з./ m^3 . У другій та третій декадах травня фіксували поодинокі пилкові зерна на препаратах. Пилковий сезон становив 29 днів; початок – 30.03, кінець – 27.04. Виявлено низький негативний статистично достовірний кореляційний зв'язок між відотною вологістю повітря та концентрацією пилку ($r_{\text{hum}\%} = -0,2075$). Залежність між вмістом в опаді пилкових зерен берез та температурою атмосферного повітря була статистично недостовірною ($r_{\text{hum}\%} = -0,03525$).

У 2015 році в повітрі міста перші пилкові зерна берез були зареєстровані наприкінці першої декади березня, при цьому температура та відносна вологість становили $+3-4^{\circ}\text{C}$ та 64–66 % (рис. 1В). До початку другої декади квітня концентрація пилкових зерен була низькою і не перевищувала 9 п.з./ m^3 , а в окремі дні (11, 13, 15, 18, 20, 22.03; 4–5.04) пилку на препаратах не фіксували, що пов'язано з випаданням дощів та підвищенням відносної вологості до 95%. Одноденне різке зростання концентрації пилкових зерен спостерігали 15 квітня (655 п.з./ m^3), при температурі $+10^{\circ}\text{C}$ та відносній вологості до 52%. З 16.04 концентрація пилку знизилася і по 21.04 не перевищувала 67 п.з./ m^3 , при цьому спостерігали зниження середньодобової температури до $+4^{\circ}\text{C}$ та підвищення відносної вологості до 83%, випадали дощі. Наступне зростання кількості пилку в повітрі міста констатували 22.04 (308 п.з./ m^3) за температури $+6^{\circ}\text{C}$, та відносної вологості 66%, а 23.04 концентрація п.з. зросла до 941 при підвищенні температури до $+11^{\circ}\text{C}$ та зниженні вологості до 54%. Пік пилення зафіксовано 24.04 (1710 п.з./ m^3) за температури $+15^{\circ}\text{C}$ та відносної вологості 44%. З 25.04 кількість пилку зменшилася, але ще впродовж чотирьох наступних днів була >50 п.з./ m^3 . Дводенне зростання концентрації спостерігали 05–06.05 (80 та 147 п.з./ m^3 відповідно). Поодинокі пилкові зерна реєстрували у повітрі міста до початку червня. Пилковий сезон тривав 22 дні; початок палінації – 14.04, кінець – 05.05. Впродовж палінації на препаратах ідентифіковано 15540 п.з. Виявлено позитивну, середню за величиною, статистично достовірну кореляцію між середньодобовою температурою і концентрацією пилку ($r_{\text{t}^{\circ}\text{C}} = +0,4706$) та негативну між відотною вологістю і кількістю пилку у повітрі ($r_{\text{hum}\%} = -0,3439$).

Отже, появу пилкових зерен берези в атмосферному повітрі впродовж 2013–2015 років констатовано за температури від $+2,3^{\circ}\text{C}$ (у 2013) до $+5,3^{\circ}\text{C}$ (у 2014) та відносної вологості 64–91 %. Низька температура на початку палінації та березнева погодна аномалія у 2013 році (зниження температури до -10°C) призвели до пізнішого початку пилкового сезону та низьких концентрацій пилку. Зокрема, незначний вміст пилкових зерен реєстрували до початку третьої декади квітня, а максимум – 27.04 (359 п.з./ m^3). Натомість висока температура у 2014 році (до $+14^{\circ}\text{C}$) пришвидшила початок пилення. Висока концентрація пилку була вже наприкінці березня, після чого зафіксовано швидке настання піку пилення (31.03) із кількістю 1934 п.з./ m^3 . Значний вплив на вміст пилкових зерен у повітрі, особливо на початку палінації, мав напрям переважаючих вітрів. Зокрема, підвищення концентрації пилку спостерігали в період переважання південно-східних та південно-західних вітрів. Разом з тим за умов підвищеної відносної вологості та випадання дощу констатували різке зниження вмісту пилку у повітрі. Найменшу кількість пилкових зерен впродовж року зареєстровано у 2013 році (4363), найбільшу – у 2014 (29074), що пояснюється ендегенними особливостями представників даного таксону. У науці відоме явище почерговості формування великої асиміляційної поверхні листків цих рослин в один рік і великої кількості чоловічих суцвіть у наступний. Значне продукування пилку та його вивільнення у великих кількостях потребує від рослин великих затрат енергії і тому в

наступний рік це призводить до гальмування розвитку їхніх суцвіть. Тобто рік із високими концентраціями п.з. настав після року із низьким їхнім вмістом.

У Івано-Франківську було виявлено негативний кореляційний зв'язок між концентрацією пилку та відносною вологістю впродовж усіх років спостереження. З середньодобовою температурою повітря кореляція була позитивною у 2013 та 2015 роках, а у 2014 кореляційний зв'язок був статистично недостовірний. Аналіз середньодобової температури повітря та концентрації пилку у містах Кракові та Любліні показав, що існує позитивна статистично достовірна кореляція між зазначеними параметрами та негативна між вмістом пилку та відносною вологістю повітря (Myszkowska, Piotrowicz, 2009; Piotrowska-Weryszko, Weryszko-Chmielewska, 2014). У Вінниці, аналізуючи вплив погодних умов на характер палінації, було виявлено позитивну кореляцію між кількістю пилку у повітрі та температурою (коефіцієнт кореляції Кендалл Тау коливався від 0,2 до 0,4); достовірні негативні кореляції між вмістом пилку усіх деревних (на відміну від трав) та відносною вологістю і атмосферними опадами (Родінкова, 2012).

З аероалергенної точки зору найбільш несприятливим у м. Івано-Франківську був сезон пилення у 2014 році, коли впродовж місяця, з 28.03 по 27.04, вміст пилку перевищував пороговий рівень. У 2013 році перевищення порогового рівня концентрації пилку у повітрі спостерігали впродовж семи днів, з 24.04 по 30.04. У 2015 – впродовж восьми днів, 15.04 та з 22.04 по 28.04. На нашу думку, доцільно пацієнтам лікарів-алергологів запропонувати вести відповідні щоденники, де б фіксувався стан самопочуття в період масового цвітіння алергенних рослин. Співставлення отриманих результатів з даними аеропалінологічного дослідження дозволить лікарям отримати більш чітку клінічну картину, виявити групи ризику, розробити відповідні рекомендації із запобігання розвитку полінозів. Подальші аеропалінологічні дослідження слід розвивати у напрямку співпраці із спеціалістами різних напрямків: ботаніків, екологів, гігієністів, лікарів-алергологів, метеорологів.

Висновок

В результаті дослідження виявлені особливості кількісної динаміки пилку представників роду *Betula* у повітрі м. Івано-Франківськ. Встановлено, що найбільш інтенсивно палінація проходить при температурі від +10 до +19°C та вологості 58–70 %, середня тривалість пилкового сезону становить 25 днів; максимальну концентрацію пилку в повітрі можна очікувати в третій декаді квітня, а за наявності відповідних метеорологічних умов (високих температур до і на початку пилення, низької відносної вологості, домінування південно-східних та південно-західних вітрів) – наприкінці березня – початку квітня. Були підтверджені дані про наявність негативного кореляційного зв'язку між концентрацією пилку та відносною вологістю (впродовж усіх років спостереження), позитивної кореляції між вмістом пилку та температурою повітря (у 2014 – статистично не достовірна).

Отримані дані можуть бути використані для складання календаря пилення берез. Разом із результатами наступних спостережень вони дозволять здійснювати прогнозування аеропалінологічної ситуації у місті. Застосоване в роботі обладнання та методичні підходи дозволяють виявити клінічно значущу концентрацію пилку, при якій (теоретично) можуть з'явитися перші симптоми полінозу. Разом з тим, доцільно обладнати пункт спостереження сучасним пилковловлювачем типу Буркард. Перспектива входження до Європейської Аероалергенної мережі вимагає проведення подальших досліджень за методикою, запропонованою Європейським аеробіологічним співтовариством.

Список літератури

Архів погоди. ([http://rp5.kz/Архів_погоди_в_Івано-Франківську_\(аеропорт\)](http://rp5.kz/Архів_погоди_в_Івано-Франківську_(аеропорт))) /Arkhiv pogody. ([http://rp5.kz/Arhiv_pogodi_v_Ivano-Frankivs'ku_\(aeroport\)](http://rp5.kz/Arhiv_pogodi_v_Ivano-Frankivs'ku_(aeroport)).)

Волощук К.В. Календар пилення алергенних рослин у місті Львові (2011 рік) // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2014. – №65. – С. 170–179. /Voloshchuk K.V. Kalendar pylennya alergennykh roslyn u misti L'vovi (2011 rik) // Visnyk L'vivs'kogo universytetu. Seriya biologichna. – 2014. – №65. – S. 170–179./

Воробець Н.М., Калинович Н.О. Напрямки та перспективи аеропалінологічного моніторингу в Україні // Укр. мед. часопис. – 2012. – №4 (90). – С. 26–29. /Vorobets' N.M., Kalynovych N.O. Napryamky ta perspektyvy aeropalynologichnogo monitoryngu v Ukraini // Ukr. med. chasopys. – 2012. – №4 (90). – S. 26–29./

Лисенко М. Зелені насадження в урбанізованому середовищі міста Івано-Франківська // Вісник Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Серія Біологія. – 2007. – Вип. VII–VIII. – С. 236–240. /Lysenko M. Zeleni nasadzhennya v urbanizovanomu seredovyshchi mista Ivano-Frankivs'ka // Visnyk Prykarpats'kogo natsional'nogo universytetu imeni Vasyl'ya Stefanyka. Seriya Biologiya. – 2007. – Vyp. VII–VIII. – S. 236–240./

- Мейер-Меликян Н.Р., Северова Е.Э., Гапочка Г.П. и др. Принципы и методы аэропаллинологических исследований. – Москва, 1999. – 48с. /Meyer-Melikyan N.R., Severova Ye.E., Gapochka G.P. i dr. Printsipy i metody aeropalinologicheskikh issledovaniy. – Moskva, 1999. – 48s./
- Мінарченко В.М., Тимченко А.К. Атлас лікарських рослин України: хорологія, ресурси та охорона. – К.: Фітосоціоцентр, 2002. – 172с. /Minarchenko V.M., Tymchenko A.K. Atlas likars'kykh roslin Ukrainy: khorologiya, resursy ta okhorona. – K.: Fitosotsiotsentr, 2002. – 172s./
- Олійник М.П., Гнезділова В.І. Дендрофлора міста Івано-Франківська // Вісник Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника. Серія Біологія. – 2009. – Вип. XIV. – С. 18–23. /Oliynyk M.P., Gnyezdilova V.I. Dendroflora mista Ivano-Frankivs'ka // Visnyk Prykarpats'kogo natsional'nogo universytetu imeni Vasylya Stefanyka. Seriya Biologiya. – 2009. – Vyp. XIV. – S. 18–23./
- Приходько О.Б., Стеблюк М.В., Ємець Т.І. та ін. Пилковий календар Запоріжжя // Запорізький медичний журнал. – 2010. – Т. 12, №1. – С. 19–22. /Prykhod'ko O.B., Steblyuk M.V., Yemets' T.I. ta in. Pylkovyy kalendar Zaporizhzhya // Zaporiz'kyu medychnyy zhurnal. – 2010. – T. 12, №1. – S. 19–22./
- Родінкова В.В. Вплив кліматичних змін на пилкування алергенної флори у Вінниці та чутливість пацієнтів до пилку // Environment & health. – 2012. – №3. – С. 40–45. /Rodinkova V.V. Vplyv klimatychnykh zmin na pylkuvannya alergennoyi flory u Vinnytsi ta chutlyvist' patsiyentiv do pylku // Environmental & health. – 2012. – №3. – S. 40–45./
- Allergenic pollen: a review of the production, release, distribution and health impacts / Eds. M.Sofiev and K.-S.Bergmann. – Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2013. – 213p.
- Bassett I.J., Crompton C.W., Parmele J.A. An atlas of airborne pollen grains and common fungus spores of Canada. – Ottawa, 1978. – 322p.
- Galan C., Emberlin J., Dominiquez E. A comparative analysis of daily variations in the Gramineae pollen counts in Cordoba, Spain and London UK // Grana. – 1995. – Vol.34. – P.189–198.
- Jager S., Berger U., Smith M. European Network, new challenges // Alergologia Immunologia. – 2012. – №9 (2–3). – P. 69–71.
- Kasprzyk I. Co-occurrence of airborne allergenic pollen grains and fungal spores in Rzeszów, Poland (2000–2002) // Acta Agrobotanica. – 2008. – №2 (61). – P. 65–73.
- Melnichenko G., Mylenka M. Quantitative and qualitative dynamics of airborne allergenic pollen concentration in the urban ecosystem of Ivano-Frankivsk (western Ukraine) // Journal of International Scientific Publications: Ecology and Safety. – 2014. – Vol.8. – P. 312–319.
- Myszkowska D., Piotrowicz K. Birch (*Betula* L.) pollen seasons in Cracow in 1991–2008 in relation to meteorological conditions // Acta Agrobotanica. – 2009. – №2 (62). – P. 67–75.
- Piotrowska-Weryszko K., Weryszko-Chmielewska E. The airborne pollen calendar for Lublin, central-eastern Poland // Ann. Agric. Environ. Med. – 2014. – №21 (3). – P. 541–545.
- Рус М. Пыльк brzozy w powietrzu Szczecina w latach 2000–2004 // Acta Agrobotanica. – 2006. – №1 (59). – P. 325–333.
- Sulmont G. The pollen content of the air identification key. (Electronic resource). Reseau National de Surveillance Aerobiologique. 1 CD-ROM. Production: Julie Collet. Studio Bouquet. – Saint Etienne (France), 2008.
- www.polleninfo.org

Представлено: Р.В.Козовий / Presented by: R.V.Kozovy

Рецензент: О.В.Безроднова / Reviewer: O.V.Bezrodnova

Подано до редакції / Received: 04.10.2015

••• ГЕНЕТИКА •••

(спеціальний розділ «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології»)

••• GENETICS •••

(special section "Drosophila in the experimental genetics and biology")

УДК: 612.273.2:612.014.43:577.23

Стойкість до стресу дрозофіл, адаптованих до умов гіпоксії
В.Я.Березовський, О.Г.Чака, Л.М.Плотнікова, М.І.Левашов, І.Г.Літовка, Р.В.Янко

Інститут фізіології імені О.О.Богомольця НАН України (Київ, Україна)
lenchaka@ukr.net

Проведено визначення резистентності до гіпоксії *D. melanogaster* ліній *Oregon-R* та *Canton-S*. Дрозофіл контрольної групи (I) утримували при звичайному вмісті кисню (21%). Було виділено субпопуляцію високостійких (ВГ – II група) та низькостійких (НГ – III група) до гіпоксії *D. melanogaster*. Дрозофіл II та III групи протягом 16 поколінь інкубували в умовах постійної нормобаричної гіпоксії (8–10 % O₂). Відмічено зростання стійкості самців та самок дрозофіл II групи до підвищеної температури. Термостійкість самців та самок мушок III групи обох ліній знизилася. Зростає кількість особин із позитивним фототаксисом, як самців, так і самок дрозофіл лінії *Canton-S* ВГ групи, та в групі НГ самок обох ліній. Збільшилася резистентність до аліментарної депривації самців та самок лінії *Canton-S* груп ВГ та НГ. У лінії *Oregon-R* стійкість до аліментарного стресу підвищилася тільки у самок II групи. Відмічено суттєве зростання стійкості до гіпоксії дрозофіл ВГ групи незалежно від статті. Підвищення резистентності до стресу відбувалося тільки у ВГ дрозофіл, а у особин НГ групи ефект перехресної адаптації не спостерігався.

Ключові слова: нормобарична гіпоксія, *Drosophila melanogaster*, термостійкість, фототаксис, аліментарна депривація.

Устойчивость к стрессу дрозофил, адаптированных к условиям гипоксии
В.А.Березовский, Е.Г.Чака, Л.Н.Плотникова, М.И.Левашов, И.Г.Литовка, Р.В.Янко

Проведено испытание на устойчивость к гипоксии *Drosophila melanogaster* линий *Oregon-R* и *Canton-S*. Контрольную группу (I) составили дрозофилы, которых не подвергали воздействию гипоксии. Выделено субпопуляции высокоустойчивых к гипоксии (ВГ – II группа) и низкоустойчивых (НГ – III группа) плодовых мушек. Дрозофил II и III группы инкубировали в течение 16 поколений в условиях постоянной нормобарической гипоксии (8–10 % O₂). Отмечено повышение термоустойчивости самцов дрозофил II группы обеих линий. Устойчивость самцов и самок дрозофил III группы обеих линий к высокой температуре снизилась. Увеличилось количество особей с положительным фототаксисом во II группе как самцов, так и самок дрозофил линии *Canton-S*, а также в III группе самок обеих линий. Увеличилась резистентность к алиментарной депривации самцов и самок линии *Canton-S* групп ВГ и НГ. У дрозофил линии *Oregon-R* устойчивость к алиментарному стрессу повысилась только у самок II группы. Отмечено существенное повышение устойчивости к гипоксии дрозофил ВГ группы обеих линий вне зависимости от пола. Возрастание резистентности к стрессовым воздействиям происходило только у дрозофил группы ВГ, у мушек группы НГ такой эффект перекрестной адаптации не наблюдали.

Ключевые слова: нормобарическая гипоксия, *Drosophila melanogaster*, термоустойчивость, фотореактивность, пищевая депривация.

Stress resistance of drosophila adapted to hypoxia
V.Berezovskyi, O.Chaka, L.Plotnikova, M.Levashov, I.Litovka, R.Yanko

Oregon-R and *Canton-S* *Drosophila melanogaster* stocks were tested for resistance to hypoxia. *Drosophila* control group (I) was kept at normal oxygen content (21%). Subpopulations were distinguished as high resistant to hypoxia (II group) and low resistant (III group). Flies of II and III groups were incubated in constant normobaric hypoxia (8–10 % O₂) for 16 generations. An increase in the stability of males and females of the second group to

the high temperature was marked. High temperature resistance of males and females of the III group of both stocks decreased. The number of individuals with positive phototaxis in the II group (both males and females) of *Canton-S* stock, as well as in the III group (females) of both stocks increased. Resistance to alimentary deprivation also increased in males and females of *Canton-S* stock in the groups II and III. Starvation resistance increased in *Oregon-R* stock only in females of the II group. The substantial increase of hypoxia resistance is marked for the II group of both stocks without depending on sex. The increase of resistance to stress occurred only in the II group, and in flies of the III group such effect of cross-adaptation was not observed.

Key words: normobaric hypoxia, *Drosophila melanogaster*, thermal stability, phototaxis, alimentary deprivation.

Вступ

Важливою характеристикою будь-якої популяції є її генетична гетерогенність, яка обумовлює межі адаптивних можливостей організмів і лежить в основі елементарних еволюційних процесів (Андриевский, Чернов, 2005; Берг, 1943). Стійкість видів до різних рівнів парціального тиску кисню (P_{O_2}) в повітрі істотно відрізняється. Найвищою резистентністю до гіпоксії характеризуються види, ендемічні для гірських висот (лами, мурчаки), які мають філогенетично детерміновану здатність добре переносити низькі рівні P_{O_2} (Березовский, 1978). У людей-аборигенів високогірних районів резистентність до гіпоксії також виявляється більш високою, ніж у населення рівня моря. Важливим питанням залишається дослідження залежності дисперсії генетичної мінливості від ступеня адаптації ліній до несприятливих факторів навколишнього середовища. В дослідженнях (Берг, 1943) було показано існування у дрозофіл генів-мутаторів широкої дії. Гіпоксія є одним із потужних індукторів експресії великої групи генів, у тому числі генів, що контролюють гліколіз, ангиогенез і процеси проліферації, які сприяють виживанню клітин за умов зниженого P_{O_2} (Мінченко та ін., 2013). Ссавці значно відрізняються від безхребетних за своєю морфологією й особливостями метаболізму, проте їхні гени та сигнальні шляхи філогенетично зберігаються (Zhao et al., 2011).

Одним із найбільш розповсюджених універсальних модельних видів вважається *D. melanogaster*, що має високу стійкість до гострої кисневої депривації і зберігає життєдіяльність після кількох годин перебування в атмосфері з вмістом O_2 близько 1% (Zhou et al., 2008; Wayne, 2009). Дослідженню впливу зміненого парціального тиску кисню на *D. melanogaster* присвячено багато робіт. Показано, що розмноження *D. melanogaster* при 10 та 7,5% O_2 вдвічі знижує яйценосність, зменшує розмір імаго, збільшує час розвитку на 36 годин (Pesk, Maddrell, 2005). У дрозофіл, яких протягом 32-х поколінь розмножували в атмосфері з вмістом кисню 7%, виявлено зміну експресії 2749 генів (у 1534 – збільшилася, а у 1215 – знизилася) (Zhou et al., 2008). Тривале перебування *D. melanogaster* в умовах гіпоксії призводить до зниження P_{O_2} в тканинах і субклітинних структурах, зокрема мітохондріях, що в свою чергу викликає зниження інтенсивності процесів окислення.

Встановлено, що інтенсивність процесів окислення має велике значення для виживання особини у стресових умовах. Відомо також, що між рівнем енергетичного метаболізму і довголіттям існує зворотна залежність. Зниження інтенсивності окисних процесів може стати основою для продовження життя. Показано, що гіпоксія (10–15 % O_2), яку моделювали додаванням гелію та аргону, підвищувала життєздатність імаго після теплового шоку і ультрафіолетового опромінення (Толстун, 2012). У попередніх наших роботах було досліджено вплив гіпоксичного стресу різної тривалості на ранніх етапах життя імаго на тривалість життя *D. melanogaster*. Показано збільшення тривалості життя самців при застосуванні гіпоксичного стресу протягом 20 і 30 хв. (Березовский и др., 2010). Проте досі не досліджено вплив довготривалої жорсткої гіпоксії на стійкість до інших видів стресу (харчова депривація, гіпертермія) та тривалість життя *D. melanogaster* із різною вихідною резистентністю до нестачі кисню.

Метою нашої роботи було дослідити стійкість до стресу дрозофіл, адаптованих до умов гіпоксії.

Об'єкт та методи дослідження

Дослідження проведено на *Drosophila melanogaster* ліній *Oregon-R* та *Canton-S* в кількості близько 2000 особин. Мух кожної з ліній поділили на 3 групи. Контрольну групу дрозофіл (I) утримували в атмосферному повітрі (20,9% O_2) при температурі 24°C. Для формування дослідних груп мушок попередньо визначали їх стійкість до низького парціального тиску кисню (P_{O_2}). Дрозофіл розміщували у проточній камері, в яку подавали 99,8% азоту, зі швидкістю 2,5 см³/с, знижуючи P_{O_2} в ній до 1,5 мм рт. ст. Мушок, які зберігали рухливість в таких умовах понад 30 с, вважали високостійкими до впливу гіпоксії (ВГ). Тих, що утримувалися на вертикальних стінках камери менше

30 с – низькостійкими (НГ). Кожне покоління мушок перевіряли на стійкість до гіпоксії аналогічним методом. Із нащадків ВГ мух відбирали тільки високостійких особин, із нащадків НГ – тільки низькостійких особин (табл. 1).

Селекцію високо- та низькостійких до гіпоксії особин здійснювали протягом 16 поколінь. Дослідні дрозофіли (в кількості ≈ 1000 шт.) II (ВГ) та III (НГ) груп як першого, так і всіх наступних поколінь постійно знаходилися в окремих контейнерах в атмосфері дозованої гіпоксії з вмістом кисню приблизно 8% при нормальному атмосферному тиску.

Таблиця 1.

Поділ дрозофіл на дослідні групи в залежності від їх стійкості до гіпоксії

Група	Стойкість до гіпоксії	Умови утримання
I – К	контрольні	нормоксія, 21% O ₂
II – ВГ	високостійкі	постійна гіпоксія, 8% O ₂
III – НГ	низькостійкі	постійна гіпоксія, 8% O ₂

Дрозофіл усіх груп вирощували на стандартному поживному середовищі (агар, цукор, манна крупа, дріжджі та пропіонова кислота) при температурі $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Перед проведенням тестів на стійкість дрозофіл до стресу проводили розділення імаго за статтю. Для визначення термостійкості дослідних дрозофіл їх піддавали дозованому тепловому шоку при сублетальній температурі та тривалості впливу, які давали можливість оцінити різницю в термостійкості (Чепель, Алексеев, 1971). Для проведення термотесту мушок розсаджували по 10 особин у скляні пробірки. Пробірки розташовували у термостаті при температурі 41°C протягом 50 хв. Через 2 год після закінчення тестування в кожній групі визначали кількість живих особин. Термостійкість визначали як частку особин (%), що вижили після нагрівання, від загальної кількості дрозофіл, яких піддавали впливу гіпертермії.

Стойкість 16-го покоління дослідних дрозофіл кожної групи до жорсткої гіпоксії (0,2% O₂) визначали шляхом вимірювання часу утримання мушок на вертикальних стінках та часу відновлення рухової активності після гіпоксичного шоку першої та останньої дрозофіли, по методиці (Березовський, 1978). Розраховували середній час реституції дрозофіл кожної групи. Визначали коефіцієнт швидкості реституції, як відношення середнього часу реституції до часу утримання на стінках пробірок.

Для визначення кількості особин з позитивною фотореакцією у кожній групі проводили тест на фототаксис у спеціально сконструйованому у нашому відділі пристрої, по модифікованій нами методиці (Воробйова, Анопрієва, 2004). Для цього дрозофіл розміщували у темній трубці, яка була з'єднана з прозорою трубкою. Через 1 хвилину, коли дрозофіли переходили зі стресового стану у спокійний, збоку прозорої трубки вмикали світло. Визначали кількість дрозофіл, які знаходилися в освітленій та затемненій частинах приладу. Розраховували відсоток мушок із позитивним та негативним фототаксисом.

Стойкість дрозофіл кожної групи до голодування визначали, розміщуючи їх по 10–15 особин у пробірки без корму та води. Кількість живих особин оцінювали через кожні 2 години. По отриманим даним будували криву вимирання, розраховували середню – СТЖ та максимальну тривалість життя – МТЖ (тривалість життя 90% мух), а також час загибелі 50% дрозофіл ($t_{1/2}$) (Жукова, Кисилева, 2011).

Статистичний аналіз отриманих даних здійснювали за допомогою пакету статистичних програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Для оцінки вірогідності різниці між групами використовували χ -критерій Пірсона та t-критерій Стьюдента. Для оцінки вірогідності розбіжностей за тривалістю життя використовували непараметричний критерій Колмогорова-Смирнова (Большев, 1987).

Результати та обговорення

Адаптаційні можливості організму можна оцінювати за результатами дослідження його стійкості до несприятливих впливів оточуючого середовища. Для такої оцінки ми провели моделювання кількох екзогенних дестабілізуючих факторів: метаболічного стресу, викликаного повним голодуванням, та термостресу внаслідок дії підвищеної температури. Порівнюючи здатність контрольних комах різних ліній виживати в екстремальних умовах підвищеної температури, можна відзначити, що дрозофіли лінії *Canton-S* краще переносили термотест. У самців і самок цієї лінії відсоток особин, які витримали термотест, був на 20% вищим, ніж у дрозофіл лінії *Oregon-R*. Самки як контрольних, так і дослідних

груп краще, ніж самці, переносили дію високої температури. Це відповідає загальнобіологічному принципу більшої стійкості самиць до несприятливих факторів оточуючого середовища (Zhou et al., 2007). Аналіз результатів термотесту показав, що у НГ самців лінії *Canton-S* стійкість до підвищеної температури після адаптації до гіпоксії зменшилася. Розбіжності між I та III групою були статистично значимі (за χ -критерієм Пірсона). У ВГ самців цієї лінії спостерігали деяке збільшення термостійкості, кількість живих особин після термотесту збільшилася на 3%. У самок дрозофіл лінії *Canton-S* після адаптації до гіпоксії II групи стійкість до високої температури змінювалася інакше. В групі ВГ кількість живих особин після термостресу зменшилася на 6%, а в групі НГ – збільшилася на 77%. У ВГ самців та самок лінії *Oregon-R* відсоток живих особин після термотесту був більше на 6%, порівняно з контрольною групою. У НГ особин лінії *Oregon-R*, як у самців, так і у самок стійкість до підвищеної температури знизилася. Кількість живих особин була на 8 та 14% менше порівняно з контролем (табл. 2).

Таблиця 2.
Стійкість дрозофіл лінії *Canton-S* та *Oregon-R* до підвищеної температури (% живих після термотесту)

Лінія	<i>Canton-S</i>		<i>Oregon-R</i>	
	самці	самки	самці	самки
I	53,27 (n=128)	68,9 (n=177)	37,83 (n=155)	47,69 (n=190)
II	56,38 (n=129)	62,8 (n=156)	43,18 (n=242)	54,54 (n=235)
III	31,48* (n=191)	77,05 (n=119)	29,17 (n=208)	33,33* (n=112)

* – статистично значимі розбіжності за χ -критерієм Пірсона.

Зниженню стійкості дрозофіл, адаптованих до гіпоксії, до термостресу, можливо, сприяла «детренованість» систем антиоксидантного захисту внаслідок хронічного зменшення споживання кисню та недостатнього утворення його активних форм, що діють як сигнальні молекули мітохондріального гормезису і мають важливе значення для термостійкості організму (Ristow, Schmeisser, 2011).

Відомо, що важливою характеристикою функціонального стану мух є їх спонтанна рухова активність, яка пов'язана з рівнем освітлення. Рухову активність дрозофіл ми оцінювали, визначаючи їх реакцію на світло. Проведені тести показали зростання кількості особин із позитивним фототаксисом у групі ВГ дрозофіл, як самців, так і самок лінії *Canton-S*. Для НГ мух лінії *Canton-S* відмічено збільшення особин із позитивним фототаксисом серед самок. У самців цієї групи, навпаки, – зросла частка мух з негативною реакцією на світло. У лінії *Oregon-R* кількість мушок із позитивною реакцією збільшилася тільки у НГ самок (вірогідно за χ -критерієм Пірсона). В групі ВГ дрозофіл лінії *Oregon-R* (як самців, так і самок) відсоток мушок із позитивним фототаксисом статистично вірогідно зменшився (рис. 1).

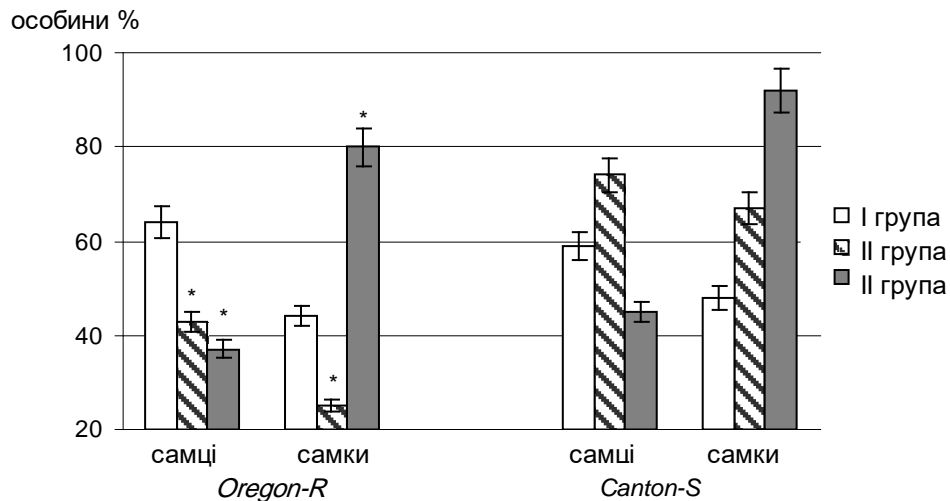
Проведені нами дослідження виявили, що внаслідок селекції мух за стійкістю до гіпоксії у ВГ особин лінії *Canton-S* збільшилась позитивна реакція на світло, а у дрозофіл лінії *Oregon-R* вона, навпаки – зменшилась. В дослідженнях, проведених нами раніше на дрозофілах ліній *Canton-S*, Чорнобиль та Умань було виявлено збільшення відсотку особин із позитивною реакцією на світло у ВГ дрозофіл Умань (Чака та ін., 2008).

Поведінка особини – це, з одного боку, генетично детермінована відоспецифічна програма, а з іншого – лабільна система адаптації до мінливих умов зовнішнього середовища. Дослідженнями, проведеними на 20 природних лініях дрозофіл різного походження, показано, що фотореакція – це генетично детермінована ознака, на яку впливають будь-які мутації. Дослідження наслідування фотореакції свідчать про полігенний характер наслідування з переважним вкладом II та III хромосоми (Dobzhansky et al., 1974, Polivanov, 1975).

Стійкість до аліментарної депривації дрозофіл лінії *Canton-S*, II та III групи, адаптованих до гіпоксії, підвищилася. У самців і самок дрозофіл лінії *Canton-S* збільшилася СТЖ, МТЖ та $t\frac{1}{2}$. У резистентних самців II групи СТЖ збільшилася на 8 годин, а у самок на 13 год порівняно з контрольною групою, МТЖ зросла на 7 та 10 год відповідно, а $t\frac{1}{2}$ на 7 та 6 год відповідно (рис. 2, табл. 3).

У дрозофіл лінії *Oregon-R*, адаптованих до гіпоксичних умов, стійкість до голодування, навпаки, зменшилась. У самок II групи підвищилась МТЖ на 7 год, але СТЖ зменшилася на 1,9 год, а $t_{1/2}$ на 8 год, порівняно з контрольною групою. У ВГ самців цієї лінії СТЖ залишалася близькою до контрольних значень, а $t_{1/2}$ скоротилася на 3 год. У самців НГ групи лінії *Oregon-R* СТЖ була нижче, ніж у контрольних особин, на 3 год, а $t_{1/2}$ на 6 год. У самок цієї групи СТЖ зменшилася на 12,4 год, а $t_{1/2}$ на 10 год (рис. 2, табл. 3).

Проведені дослідження показали, що у дрозофіл лінії *Canton-S* ефект перехресної адаптації під впливом довготривалої гіпоксії проявлявся більш суттєво, ніж у мушок лінії *Oregon-R*.



* – вірогідно за χ -критерієм Пірсона.

Рис. 1. Відсоток дрозофіл із позитивним фототаксисом у контрольних та дослідних групах

Таблиця 3.
 Показники тривалості життя *Drosophila melanogaster* в умовах аліментарної депривації (год)

Лінія	<i>Canton-S</i>				<i>Oregon-R</i>			
	самці		самки		самці		самки	
	СТЖ	МТЖ	СТЖ	МТЖ	СТЖ	МТЖ	СТЖ	МТЖ
I	25,3±0,7	32	36,3±1,07	46	33,7±0,76	47	48,9±0,89	58
II	33,8±2,05*	45	49,9±1,39*	56	33,3±0,59	44	47,0±0,92	65
III	31,9±0,74*	48	33,7±0,87*	46	30,4±0,54*	40	36,5±0,9*	47

* – вірогідні розбіжності з контролем, $P \leq 0,05$.

Ми порівнювали стійкість до жорсткої гіпоксії контрольних мушок та тих, що протягом 16 поколінь знаходилися в умовах низького парціального тиску кисню ($P_{O_2}=56$ мм. рт. ст). Проведене тестування показало, що у ВГ та НГ дрозофіл, як самців, так і самок ліній *Canton-S* та *Oregon-R* час утримання на вертикальних стінках пробірок збільшився. Це може свідчити про те, що тривала адаптація до гіпоксичних умов підвищує резистентність дрозофіл до низького P_{O_2} . Найбільш виразно (в 2 рази) цей показник збільшився у самок лінії *Canton-S* (табл. 3). У той же час середній час реституції вірогідно знизився у ВГ самців лінії *Canton-S*. У ВГ самців і самок лінії *Oregon-R* цей показник мав тенденцію до зниження. У НГ самців обох ліній середній час реституції дещо збільшився, а у самок групи НГ мав тенденцію до зниження. Коефіцієнт швидкості реституції зменшився для ВГ

дрозофіл обох ліній, як у самців, так і у самок. Зменшення цього показника свідчить про підвищення резистентності ВГ дрозофіл до жорсткої гіпоксії. В групі НГ дрозофіл самок обох ліній відмічено зменшення цього показника. У НГ самців лінії *Canton-S* коефіцієнт швидкості реституції залишався на рівні контролю, а у лінії *Oregon-R* збільшився на 65% (табл. 4).

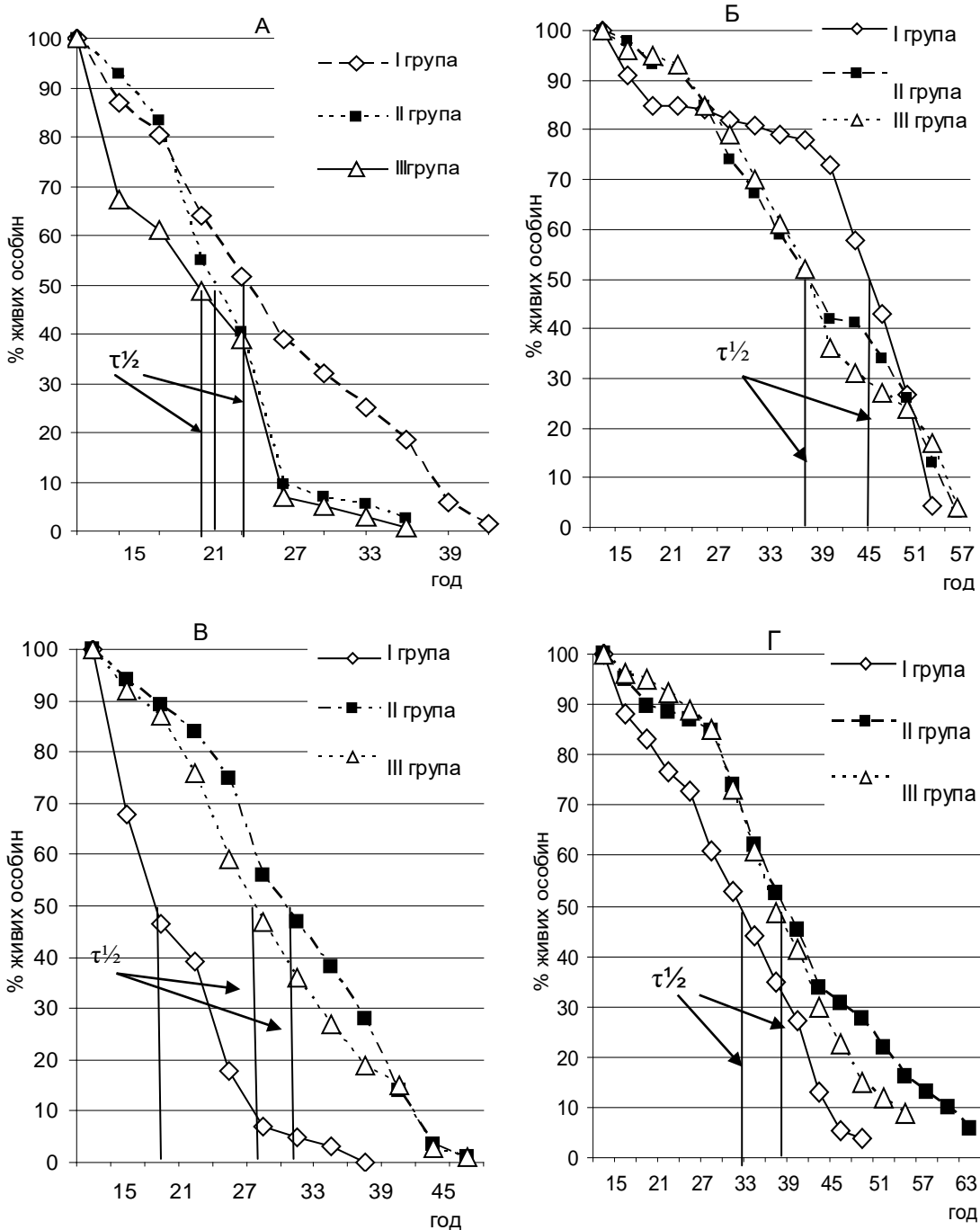


Рис. 2. Тривалість життя *D. melanogaster* при аліментарній депривації: А – *Oregon-R* самці, Б – *Oregon-R* самки, В – *Canton-S* самці, Г – *Canton-S* самки

Отримані нами результати свідчать, що адаптація до гіпоксичних умов суттєво підвищує стійкість ВГ дрозофіл до впливу жорсткої гіпоксії незалежно від статі.

Дослідження, проведені в Інституті фізіології імені О.О.Богомольця НАНУ раніше, також показали підвищення стійкості дрозофіл до жорсткої гіпоксії після адаптації протягом декількох поколінь до умов помірної гіпоксії (Березовський та ін., 2014).

Таблиця 4.

Зміни показників пристосованості до низького парціального тиску кисню дрозофіл, адаптованих до умов гіпоксії

Лінія	Стать	Група (n=100)	Час утримання на стінках, с	Середній час реституції, с	Коефіцієнт швидкості реституції
Canton-S	Самці	I	8,3 \pm 3,5	197,5 \pm 8,2	23,73
		II	10,5 \pm 2,2	179,5\pm18,8*	17,1
		III	9,5 \pm 2,3	213 \pm 33,5	22,42
	Самки	I	6,6 \pm 1,5	198,75 \pm 11,3	30,12
		II	13,0 \pm 3,0	167,5 \pm 18,3	12,8*
		III	18,0 \pm 4,1	188,75 \pm 12,6	10,49*
Oregon-R	Самці	I	11,8 \pm 3,5	159,3 \pm 19,5	13,5
		II	14,2 \pm 4,2	156 \pm 28,4	10,98
		III	12,3 \pm 3,6	253,5\pm31,2*	20,56
	Самки	I	11,3 \pm 2,8	175,75 \pm 19,5	15,55
		II	14,2 \pm 3,9	172 \pm 6,8	12,11
		III	12,6 \pm 1,5	160 \pm 17,2	12,70

* вірогідні розбіжності ($P \leq 0,05$).

Із літературних джерел відомо, що незначні за силою повторні стреси підвищують стійкість організму до сильного стресу завдяки механізму гормезису (Рушкевич та ін., 2013; Pickering et al., 2012). Внаслідок адаптації до гіпоксії підвищується стійкість організму до багатьох несприятливих впливів навколишнього середовища, навіть до токсичних речовин. Перехресна адаптація досягається внаслідок оптимізації енергетичного обміну, який стає більш ефективним та економічним (Березовський, 1978; Леутин и др., 2004; Меерсон, Пшенникова, 1988; Слоним, 1971). Адаптаційний потенціал помірної гіпоксії широко використовується для підвищення фізіологічних можливостей ссавців, їх здатності виживати у несприятливих умовах навколишнього середовища (Сиротинин, 1964).

Проведені дослідження виявили підвищення стійкості до жорсткої гіпоксії у дрозофіл обох ліній, попередньо адаптованих до низького парціального тиску кисню. У ВГ мушок водночас підвищувалася стійкість до теплового шоку, збільшилася тривалість життя при повному голодуванні. На відміну від них, у мушок НГ групи стійкість до стресових факторів навколишнього середовища, навпаки – знизилася. Отримані результати свідчать про те, що вплив адаптації до помірної гіпоксії залежить від вихідного рівня стійкості особини до низького P_{O_2} . У високостійких до гіпоксії особин внаслідок довготривалої адаптації підвищується резистентність до інших несприятливих факторів середовища, зокрема до нагрівання та голодування. У низькостійких до гіпоксії *D. melanogaster* обох ліній резистентність до теплового та аліментарного стресу, навпаки – знижується.

Список літератури

- Андрієвський А.М., Чернов І.А. Изменчивость карбоксиэстеразной системы у лабораторной популяции *Drosophila melanogaster* дикого типа // Вестник ОНУ. Биология. – 2005. – Т.10, №3. – С. 19–27. /Andriyevskiy A.M., Chernov I.A. Izmenchivost' karboksiesteraznoy sistemy u laboratornoy populyatsii *Drosophila melanogaster* dikogo tipa // Vestnik ONU. Biologiya. – 2005. – T.10, №3. – S. 19–27./
- Берг Р.Л. Зависимость изменчивости мутабельности и доминантности внутри одной свободно живущей популяции *Drosophila melanogaster* // Изв. АН СССР. Сер. Биол. – 1943. – Т.3. – С. 243–252. /Berg R.L. Zavisimost' izmenchivosti mutabel'nosti i dominantnosti vnutri odnoy svobodno zhivushchey populyatsii *Drosophila melanogaster* // Izv. AN SSSR. Ser. Biol. – 1943. – T.3. – S. 243–252./

- Березовский В.А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности. – Киев: Наукова думка, 1978. – 215с. /Berezovskiy V.A. Gipoksiya i individual'nyye osobennosti reaktivnosti. – Kiyev: Naukova dumka, 1978. – 215s./
- Березовський В.Я., Чака О.Г., Литовка І.Г., Левашов М.І., Янко Р.В. Вплив зміненого парціального тиску кисню на резистентність до гіпоксії та експресію кисеньчутливих генів *Drosophila melanogaster* // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т.60, №4. – С. 97–104. /Berezovskyy V.Ya., Chaka O.G., Litovka I.G., Levashov M.I., Yanko R.V. Vplyv zminenogo partial'nogo tysku kysnyu na rezystentnist' do gipoksiyi ta ekspresiyu kysen'chutlyvykh geniv *Drosophila melanogaster* // Fiziologichnyy zhurnal. – 2014. – T.60, №4. – S. 97–104./
- Березовский В.А., Вайсерман А.М., Литовка И.Г. и др. Влияние кратковременной кислородной депривации в раннем онтогенезе на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Пробл. старения и долголетия. – 2010. – Т.19, №2. – С. 121–127. /Berezovskiy V.A., Vayserman A.M., Litovka I.G. i dr. Vliyaniye kratkovremennoy kislorodnoy deprivatsii v rannem ontogeneze na prodolzhitel'nost' zhizni *Drosophila melanogaster* // Probl. stareniya i dolgoletiya. – 2010. – T.19, №2. – S. 121–127./
- Большев Л.Н. Теория вероятностей и математическая статистика. Избранные труды / Под ред. Ю.В.Проخورова. – М.: Наука, 1987. – 286с. /Bol'shev L.N. Teoriya veroyatnostey i matematicheskaya statistika. Izbrannyye Trudy / Pod red. Yu.V.Prokhorova. – M.: Nauka, 1987. – 286s./
- Воробйова Л., Анопрієва С. Роль мутацій *Drosophila melanogaster* Mg. у зміні пристосованості в процесі добору за фото реакцією імаго // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2004. – Вип.4. – С. 110–114. /Vorobyova L., Anopriyeva S. Rol' mutatsiy *Drosophila melanogaster* Mg u zmini prystosovanosti v protsesi doboru za foto reaktsiyeyu imago // Visnyk L'viv'skogo universytetu. Seriya biologichna. – 2004. – Vyp. 4. – S. 110–114./
- Жукова М.В., Кисилева Е.В. Влияние голодания на продолжительность жизни и апоптоз в клетках яичников *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т.15, №1. – С. 148–154. /Zhukova M.V., Kisileva Ye.V. Vliyaniye golodaniya na prodolzhitel'nost' zhizni i apoptoz v kletkakh yaichnikov *Drosophila melanogaster* // Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii. – 2011. – T.15, №1. – S. 148–154./
- Леутин В.П., Платонов Я.Г., Диверт Г.М. и др. Прерывистая нормобарическая гипоксия как экспериментальная модель незавершенной адаптации // Физиология человека. – 2004. – Т.35, №5. – С. 85–91. /Leutin V.P., Platonov Ya.G., Divert G.M. i dr. Preryvistaya normobaricheskaya gipoksiya kak eksperimental'naya model' nezavershennoy adaptatsii // Fiziologiya cheloveka. – 2004. – T.35, №5. – S. 85–91./
- Мінченко Д.О., Губеня О.В., Кубайчук К.І. та ін. Молекулярні механізми регуляції експресії генів за гіпоксії // Біологічні Студії. – 2013. – Т.7, №1. – С. 159–176. /Minchenko D.O., Gubenya O.V., Kubaychuk K.I. ta in. Molekulyarni mekhanizmy regulyatsiyi ekspresiyi geniv za gipoksiyi // Biologichni Studiyi. – 2013. – T.7, №1. – S. 159–176./
- Меерсон Ф.З., Пшеничкова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина, 1988. – 254с. /Meyerson F.Z., Pshennikova M.G. Adaptatsiya k stressornym situatsiyam i fizicheskim nagruzkam. – M.: Meditsina, 1988. – 254s./
- Рушкевич Ю.Е., Дубилей Т.А., Кошель Н.М. и др. Геропротекторный эффект блокатора μ -опиоидных рецепторов налтрексона у самок *Drosophila melanogaster* // Пробл. старения и долголетия. – 2013. – Т.22, №2. – С. 129–144. /Rushkevich Yu.Ye., Dubiley T.A., Koshel' N.M. i dr. Geroprotekorny effekt blokatora μ -opioidnykh retseptorov naltreksona u samok *Drosophila melanogaster* // Probl. stareniya i dolgoletiya. – 2013. – T. 22, №2. – S. 129–144./
- Сиротинин Н.Н. Влияние адаптации к гипоксии и акклиматизации к высокогорному климату на устойчивость животных к некоторым экстремальным воздействиям // Патол. физиология. – 1964. – №5. – С. 12–15. /Sirotnin N.N. Vliyaniye adaptatsii k gipoksii i akklimatizatsii k vysokogornomu klimatu na ustoychivost' zhivotnykh k nekotorym ekstremal'nym vozdeystviyam // Patol. fiziologiya. – 1964. – №5. – S. 12–15./
- Слоним А.Д. Экологическая физиология животных: учеб. пособие для биол. специальностей ун-тов. – М.: Высш. шк., 1971. – 448с. /Slonim A.D. Ekologicheskaya fiziologiya zhivotnykh: ucheb. posobiye dlya biol. spetsial'nostey un-tov. – M.: Vyssh. shk., 1971. – 448s./
- Толстун Д.А. Влияние искусственной атмосферы, моделированной гелием и аргонном, на развитие и стрессоустойчивость *Drosophila melanogaster* // Таврический медико-биологический вестник. – 2012. – Т.15, №3. – С. 336–339. /Tolstun D.A. Vliyaniye iskusstvennoy atmosfery, modelirovannoy geliyem i argonom, na razvitiye i stressoustoychivost' *Drosophila melanogaster* // Tavricheskiy mediko-biologicheskij vestnik. – 2012. – T.15, №3. – S. 336–339./
- Чака О.Г., Безчасна В.О., Лакхін П.В. Вплив кисневої депривації на фотореактивність та термостійкість дрозофіл // Фізіол. журн. – 2008. – Т.54, №2. – С. 55–62. /Chaka O.G., Bezchasna V.O., Lakhin P.V. Vplyv kysnevoyi depryvatsiyi na fotoreaktyvnist' ta termostiykist' drozofil // Fiziol. zhurn. – 2008. – T.54, №2. – S. 55–62./
- Чепель Л.М., Алексеев В.М. Сравнительное изучение теплоустойчивости инбредных линий и гибридов шелкопряда и дрозофилы // Устойчивость к экстремальным температурам и температурные адаптации. – Харьков, 1971. – С. 58–61. /Chepel' L.M., Alekseyev V.M. Sravnitel'noye izucheniyе teploustoychivosti inbrednykh liniy i gibridov shelkopryada i drozofily // Ustoychivost' k ekstremal'nym temperaturam i temperaturnyye adaptatsii. – Khar'kov, 1971. – S. 58–61./
- Dobzhansky T., Judson C.L., Pavlovsky O. Behavior in different environments of populations of *Drosophila pseudoobscura* selected for phototaxis and geotaxis // Proc. Natl. Acad Sci USA. – 1974. – Vol.71, №5. – P. 1974–1976.

- Peck L.S., Maddrell S.H. Limitation of size by hypoxia in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol. – 2005. – Vol.1, №303 (11). – P. 968–75.
- Pickering A.M., Vojtovich L., Tower J.A., Davies K.J. Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress // Free Radic. Biol. Med. – 2012. – Vol.55. – P. 109–118.
- Polivanov S. Response of *Drosophila persimilis* to photactic and geotactic selection // Behav. Genet. – 1975. – Vol.5, №3. – P. 255–267.
- Ristow M., Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress // Free Radic. Biol. Med. – 2011. – Vol. 51, №2. – P. 327–336.
- Zhao H.W., Haddad G.G., Jiang M. et al. Review: Hypoxic and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* // Placenta. – 2011. – Vol.32, Suppl. 2. – P. 104–108.
- Zhou D., Xue J., Chen J. et al. Experimental selection for *Drosophila* survival in extremely low O₂ environment // Plos ONE. – 2007. – Vol.2, №5. – P.490.
- Zhou D., Xue J., Lai J. C. et al. Mechanisms underlying hypoxia tolerance in *Drosophila melanogaster*: hairy as a metabolic switch // PLoS Genet. – 2008. – Vol.4, №10. – e.1000221.
- Wayne A., Van V. Metabolic function in *Drosophila melanogaster* in response to hypoxia and pure oxygen // The Journal of Experimental Biology. – 2009. – Vol.212. – P. 3132–3141.
-

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 20.03.2016

УДК: 577.25:615.076.9

Нейродегенеративні зміни та рухова активність у *Drosophila melanogaster* у разі тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* в гліоцитах**М.В.Вітушинська, Н.П.Матійців, Я.І.Черник***Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна)
m.vitushynska@gmail.com*

Встановлено, що функціональна інактивація та надекспресія гена *Sod1* у гліоцитах спричиняє виникнення нейродегенеративних змін в оптичній частці головного мозку *D. melanogaster*. Умовна площа ділянок відмерлої тканини у старих (21-денних) імаго становила $141,521 \pm 12,369$ мм² і $149,178 \pm 36,564$ мм² у випадку нокаута та надекспресії гена відповідно. У дослідних особин також зменшувалася ширина першого зорового ганглію – ламіни: $23,689 \pm 1,080$ мм (у разі інгібування) та $17,969 \pm 1,266$ мм (у разі надекспресії); у контрольних мух тканина мозку залишалась інтактною, а ширина ламіни становила $30,012 \pm 1,560$ мм. У старих особин із функціональним нокаутом гена *Sod1* в гліоцитах спостерігалась надмірна рухова активність порівняно з контрольними особинами того ж віку.

Ключові слова: *Drosophila melanogaster*, ген *Sod1*, тканинно-специфічна експресія, нейродегенерація, гліоцити, рухова активність.

Нейродегенеративные изменения и двигательная активность у *Drosophila melanogaster* при тканеспецифической экспрессии гена *Sod1* в глии**М.В.Витушинская, Н.П.Матийцев, Я.И.Черник**

Установлено, что функциональная инактивация и надэкспрессия гена *Sod1* в глии влечет за собой возникновение нейродегенеративных изменений в оптической доле головного мозга *D. melanogaster*. Условная площадь участков отмершей ткани у старых (21-дневных) имаго составляет $141,521 \pm 12,369$ мм² и $149,178 \pm 36,564$ мм² в случае нокаута и надэкспрессии соответственно. У исследованных особей уменьшалась ширина первого зрительного ганглия – ламини: $23,689 \pm 1,080$ мм и $17,969 \pm 1,266$ мм в случае ингибирования и надэкспрессии соответственно; у контрольных мух ткань мозга оставалась интактной, ширина ламини составляла $30,012 \pm 1,560$ мм. У старых особей с функциональным нокаутом гена *Sod1* в глии наблюдалась чрезмерная двигательная активность по сравнению с контрольными особями того же возраста.

Ключевые слова: *Drosophila melanogaster*, ген *Sod1*, тканеспецифическая экспрессия, нейродегенерація, глии, двигательная активность.

Neurodegenerative changes and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* at tissue-specific expression of *Sod1* gene in glial cells**M.Vitushinska, N.Matiytsiv, Ya.Chernyk**

It has been established that functional inactivation of *Sod1* gene and its overexpression in glial cell results in neurodegenerative changes in the optical lobe of *D. melanogaster* brain. Conventional area of dead tissue sectors in older (21-day) imagoes was from $141,521 \pm 12,369$ мм² to $149,178 \pm 36,564$ мм² in the cases of a knockout and overexpression respectively. In experimental animals there has been observed the decrease in the width of the first optic ganglion – lamin: $23,689 \pm 1,080$ mm and $17,969 \pm 1,266$ mm in the cases of inhibition and overexpression respectively; in control flies the brain tissue remained intact, lamin width was $30,012 \pm 1,560$ mm. In older individuals with functional knockout of the gene *Sod1* in glial cells excessive locomotor activity has been observed in comparison with the control individuals of the same age.

Key words: *Drosophila melanogaster*, gene *Sod1*, tissue-specific expression, neurodegeneration, glial cells, locomotor activity.

Вступ

Зміни на клітинному рівні, індуковані оксидативним стресом, можуть лежати в основі нейродегенеративних розладів, а також процесу старіння. Згідно вільнорадикальної теорії старіння, оксидативний стрес залучений у формування вікових патологій (Forman et al., 2004). Мозок і нервова система загалом є найбільш чутливими до такого патогенезу. На сьогодні існують докази залучення

оксидативного стресу у розвиток багатьох нейродегенеративних захворювань людини, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, бічний аміотрофічний латеральний склероз (БАС) та ін. (Владимиров и др., 1991; Andersen, 2004). Лише для БАС відомий безпосередній зв'язок між геном *SOD1* та сімейними формами захворювання із домінуючим успадкуванням. БАС є летальним нейродегенеративним захворюванням, зумовленим селективною дегенерацією верхніх і нижніх мотонейронів, що призводить до м'язової денервації і паралічу (Forman et al., 2004). Ефективної терапії для БАС немає, тому розуміння патогенезу захворювання може допомогти в розробці ефективних методів лікування. Відомо більше 160 мутацій у гені *SOD1*, що зумовлюють токсичну активність ферменту (Andersen, 2004). Нейродегенеративні захворювання часто супроводжуються порушенням параметрів поведінки, зокрема: тремором, порушенням координації рухів, м'язовою ригідністю, гіпокінезією та гіперкінезією (Chad et al., 2014). На даний час для вивчення нейродегенеративних розладів широко використовують модельні об'єкти. *Drosophila melanogaster* має низку переваг: висока гомологія генів людини і дрозофіли, консервативність клітинних механізмів і сигнальних шляхів, складно організована нервова система та можливість проводити стандартизовану оцінку поведінкових реакцій (Crapo et al., 1992).

Попередньо нами було з'ясовано, що функціональна інактивація та надекспресія гена *Sod1* у нейронах (з використанням драйвера *elav-Gal4*) *D. melanogaster* зумовлювала зниження тривалості життя дослідних комах, проте специфічного нейродегенеративного фенотипу в структурі мозку не спостерігалось (Вітушинська та ін., 2015). Це дає змогу припустити, що всупереч очікуванням, дисфункція ферменту Cu/Zn супероксиддисмутази у нейронах не є визначальною причиною формування нейродегенеративного фенотипу у мутантів дрозофіли. Ймовірно, первинна дегенерація виникає в інших клітинах мозку або відростках нейронів, а масштабне відмирання тканини, що захоплює власне нейрони, відбувається вторинно (Dirrena et al., 2015). Нещодавні дослідження вказують на участь у патогенезі нейродегенеративних захворювань автономного механізму, в якому беруть участь суміжні і функціонально споріднені клітини, такі як олігодендроцити, астроцити та мікроглія (Tafari et al., 2015).

Метою роботи було дослідити вплив тканинно-специфічної експресії *Sod1* у гліальній тканині на розвиток нейродегенеративних змін та рухову активність *D. melanogaster*.

Об'єкти та методи дослідження

Матеріалом досліджень були трансгенні лінії *D. melanogaster*, одержані з Bloomington Drosophila Stock Center:

w^{}; P{UAS-Sod1-RNAi}* – експресує dsRNA для RNA інтерференції гена *Sod1*, під контролем UAS промотора;

w¹¹¹⁸; P{UAS-Sod1} – експресує додаткову копію гена *Sod1*, під контролем UAS промотора; драйверна лінія *Repo-Gal4/TM3, Ser* (люб'язно надана проф. К.-Ф.Фішбахом) – специфічно експресує Gal4 у всій гліальній тканині мозку дрозофіли.

Тканинно-специфічну експресію генів здійснювали за допомогою бінарної UAS-Gal4 системи (Jones, 2009).

Відомо, що драйверні лінії можуть мати власний неспецифічний фенотип (Jones, 2009), тому для виключення даного ефекту позитивним контролем слугували особини першого покоління від схрещування драйверної лінії з диким типом (*Repo-Gal4/Oregon-R*); негативним контролем була лінія дикого типу *Oregon-R*.

Культури утримували на стандартному середовищі за температури 25°C (Ashburner, 1989).

Дегенеративні зміни в тканині виявляли на гістологічних зрізах мозку дрозофіли, виготовлених за стандартною методикою (Heisenberg, Bohl, 1979). Аналізували препарати на мікроскопі LobaVal-3 Corl 2 Zeiss-Jena в ультрафіолетовому світлі при збільшенні 15×40. Площу відмерлих ділянок у тканині мозку трансгенних особин обчислювали, аналізуючи мікрофотографії у графічному редакторі Komras 13 portable mini. Підраховували загальну кількість пікселів виділеної ділянки на фотографії з подальшим автоматичним переведенням даного показника в мм², враховуючи роздільну здатність опрацьованого зображення. Результати представлені у вигляді $M \pm m$ (M – середнє арифметичне, m – похибка середнього арифметичного). Аналізували не менше 10 особин кожного генотипу (Chad et al., 2014).

Для оцінки рухової активності методом «відкритого поля» використовували установку, яка складалась із скляної чашки Петрі діаметром 7 см, дно якої розграфлене на квадрати зі стороною 0,5

см. Чашку накривали плоскою скляною накривкою із такого ж скла. Протягом експерименту проводили 10-хвилинний відеозапис після 2-хвилинної адаптації мух. Відзнятий матеріал аналізували на комп'ютері, оцінювали довжину пробігу в сантиметрах, при цьому перетин одного квадрата рахували пробігом 0,5 см. В кожному досліді аналізували молодих (3–4-денних) та старих (19–21-денних) самців індивідуально, не менше 10 особин кожного генотипу та вікової категорії (Матійців та ін., 2013).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 03. Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою двофакторного Т-тесту з різними дисперсіями та критерію Пірсона. Двома зірочками позначено (**) достовірну різницю при рівні значущості $p \leq 0,01$, однією (*) – $p \leq 0,05$.

Результати і обговорення

Для визначення ролі білка Sod1 у формуванні та функціонуванні гліальної тканини мозку дрозофіли нами було застосовано тканинно-специфічний функціональний нокаут і надекспресію послідовності *Sod1* із використанням бінарної системи UAS/Gal4 (Jones, 2009).

Особини необхідного генотипу (w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$ та w^{1118} ; $P\{UAS-Sod1\}/Repo-Gal4$) одержували в першому поколінні. Контролем у даному випадку були імаго *Repo-Gal4/Oregon-R* та *Oregon-R*.

Унаслідок аналізу тканини мозку мух з генотипом w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$ із функціональним нокаутом гена *Sod1* у глії було виявлено специфічний фенотип ($n=100$ особин кожного генотипу) (рис. 1). В ділянці, що відповідає переходу ламіни у ретину та медулу, де є найбільше скупчення гліоцитів, спостерігалися поодинокі ділянки відмерлої тканини мозку вже у молодому (3-денному) віці. При старінні комах нейродегенеративні зміни були більш широкими. У старих (21-денних) комах зони нейродегенерації були чітко сформованими. Аналогічний фенотип спостерігався і у разі надекспресії дослідного гена. У контрольних особи із генотипом *Repo-Gal4/Oregon-R* структура тканини у цій ділянці мозку була суцільною в імаго двох вікових категорій (рис. 1).

Для кількісної оцінки нейродегенеративних змін ми обрахували площу зон відмерлої тканини, аналізуючи мікрофотографії за допомогою графічного редактора Kompas 13 portable mini. Встановлено, що середня площа відмерлих ділянок в оптичній частці мозку 3-денних особин складала $106,810 \pm 11,388$ мм² у випадку нокаута та $119,178 \pm 15,126$ мм² у разі надекспресії гена *Sod1* в гліоцитах. У контрольних мух тканина мозку була неушкодженою (табл. 1). З віком (у 21-денних імаго) площа нейродегенерації збільшувалася і становила $141,521 \pm 12,369$ мм² та $149,178 \pm 36,564$ мм² у випадку нокаута та надекспресії гена *Sod1* відповідно (табл. 1).

Таблиця 1.

Умовна площа зон дегенерації в оптичній частці мозку імаго *D. melanogaster* різного віку в контролі та у разі тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* у гліоцитах

Генотип ♂, n=10	Площа зон дегенерації, мм ² (M±m)	
	3-денні імаго	21-денні імаго
<i>Oregon R/Repo-Gal4</i>	0	0
w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$	$106,810 \pm 11,388$	$141,521 \pm 12,369^{**}$
w^{1118} ; $P\{UAS-Sod1\}/Repo-Gal4$	$119,178 \pm 15,126$	$149,178 \pm 36,564^*$

Примітка: рівні значущості $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,05$ (*) порівняно із контрольними особинами.

Аналізуючи оптичну частку мозку особин із тканинно-специфічною експресією гена *Sod1* у гліоцитах, ми помітили ще одну морфологічну зміну – зменшення ширини ламіни, так званий фенотип «вузької ламіни». У дослідних комах такий фенотип спостерігався вже у молодому віці – ширина ламіни становила $24,909 \pm 1,456$ у випадку нокаута та $22,163 \pm 2,456$ у разі надекспресії, в той час як у контрольних комах – $29,047 \pm 2,031$. У 21-денних контрольних імаго ширина ламіни становила $30,012 \pm 1,560$ мм, у той час як у дослідних комах з віком спостерігалася статистично достовірне зниження даного показника до $23,689 \pm 1,080$ мм у випадку нокаута та до $17,969 \pm 1,266$ мм у разі надекспресії гена *Sod1* (табл. 2, рис. 1).

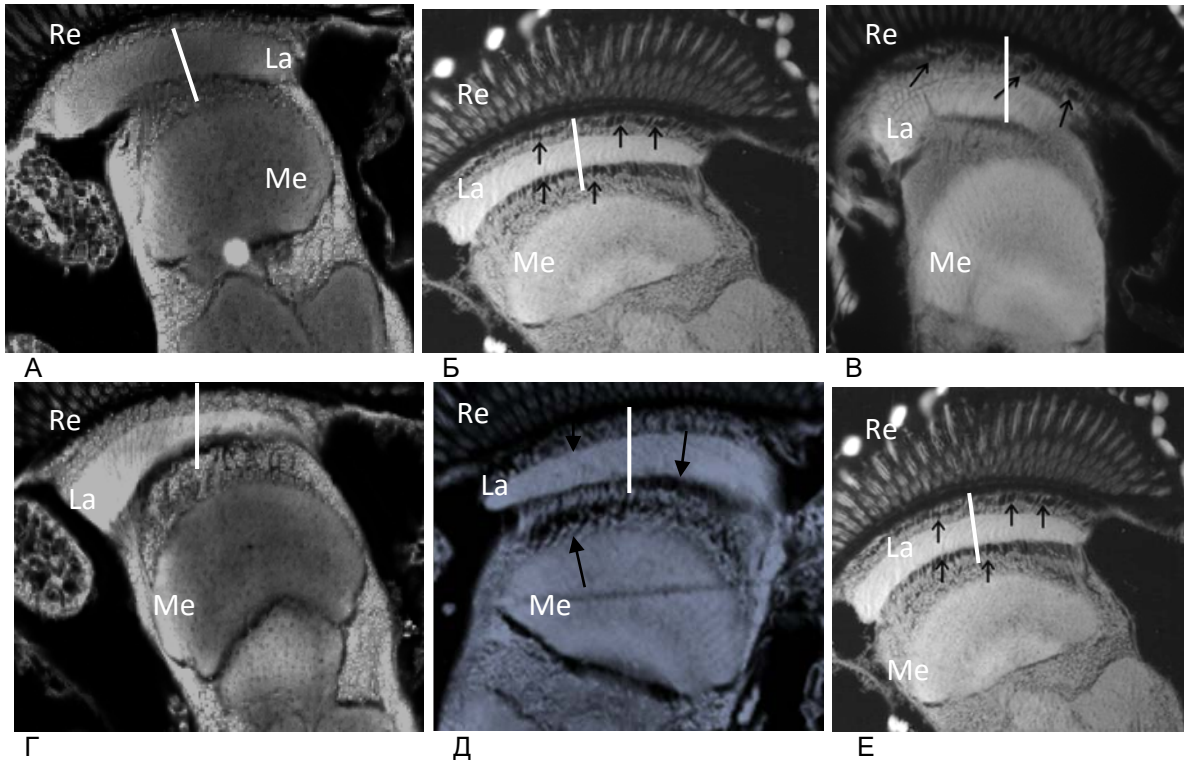


Рис. 1. Фенотип тканини мозку імаго *D. melanogaster* двох вікових груп (3-денні та 21-денні): А) молоді контрольні особи *Repo-Gal4/Oregon R*; Б) молоді особи *UAS-Sod1-RNAi/Repo-Gal4*; В) молоді особи *UAS-Sod1/Repo-Gal4*; Г) старі контрольні особи *Repo-Gal4/Oregon R*; Д) старі особи *UAS-Sod1-RNAi/Repo-Gal4*; Е) старі особи *UAS-Sod1/Repo-Gal4*. Re – ретина, La – ламіна, Me – медула. Стрілки вказують на нейродегенеративні зміни у тканині мозку; ділянка, в якій визначали ширину ламіни, – біла лінія

Використана нами драйверна лінія *Repo-Gal4* забезпечує активацію експресії генів в усіх типах гліальних клітин. У ламіні можна розрізнити шість морфологічно відмінних класів гліальних клітин, що утворюють відповідні популяції і розташовані в дистально-проксимальній площині в наступній послідовності: верхівкова глія, глія псевдокартриджу, дистальна (зовнішня) та проксимальна (внутрішня) сателітна глія, епітеліальна та маргінальна глія (Aritz, Salecker, 2014). В інших ділянках мозку дрозофіли структура глії є менш складною. Виявлений нами фенотип «вузької ламіни» дозволяє припустити, що зміна експресії гена *Sod1* у глії може призводити не лише до дегенерації тканини, але і до порушення нормального формування складних структур оптичної частки мозку дрозофіли.

Таблиця 2.

Умовна ширина ламіни в імаго *D. melanogaster* різного віку в контролі та у разі тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* у гліюцитах

Генотип ♂, n=10	Ширина ламіни, мм (M±m)	
	3-денні імаго	21-денні імаго
<i>Oregon R/Repo-Gal4</i>	29,047±2,031	30,012±1,560
<i>w[*]; P{UAS-Sod1-RNAi}/Repo-Gal4</i>	24,909±1,456	23,689±3,080**
<i>w¹¹¹⁸; P{UAS-Sod1}/Repo-Gal4</i>	22,163 ±2,456	17,969±1,266**

Примітка: рівень значущості $p \leq 0,05$ (*) порівняно із контрольними особинами

Для з'ясування впливу тканинно-специфічної експресії гена *Sod1* у гліюцитах на рухову активність дослідних комах ми використали метод «відкритого поля». Метод ґрунтується на фіксації довільної поведінки комах і дозволяє оцінити одразу декілька поведінкових параметрів: час спокою, час вмивання, загальний пробіг та кількість стрибків. Оцінювали самців двох вікових груп – молодих (3–5-денних) та старих (21-денних).

У молодих контрольних імаго (*Repo-Gal4/Oregon-R*) та особин із функціональним нокаутом гена *Sod1* (w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$) параметри рухової активності не відрізнялися. З віком у контрольних самців достовірно зменшувався загальний пробіг, що вказує на закономірне зниження довільної рухової активності із старінням. У старих трансгенних особин (w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$), цей показник достовірно зростав порівняно з контролем (табл. 3). Разом з тим, у цих особин суттєво зменшувався час спокою; щодо часу вмивання і кількості стрибків, то ці показники достовірно не відрізнялися від значень контрольних імаго (*Repo-Gal4/Oregon-R*).

Таблиця 3.

Рухова активність у «відкритому полі» молодих (3–5-денних) і старих (19–21-денних) самців *D. melanogaster* в контролі та із функціональною інактивацією гена *Sod1*

Генотип ♂, n=10	Параметри рухової активності							
	Час спокою, хв. (M±m)		Час вмивання, хв. (M±m)		Загальний пробіг, см (M±m)		Кількість стрибків, n (M±m)	
	молоді	старі	молоді	старі	молоді	старі	молоді	старі
<i>Oregon-R/Repo-Gal4</i>	0,473± 0,18516	0,833± 0,3015	3,602± 0,68029	4,759± 0,592	248,540± 46,961	121,470± 22,195*	6,304± 1,158	6,523± 1,403
w^* ; $P\{UAS-Sod1-RNAi\}/Repo-Gal4$	0,155± 0,093	0,041± 0,016*	4,177± 0,851	2,782± 0,534*	213,540± 44,355	222,400± 32,476*	5,416± 1,876	5,416± 0,681

Примітка: рівень значущості $p \leq 0,05$ (*) порівняно із контрольними особинами.

Подібний стан гіперкінезії описано у людей із деякими нейрональними розладами, зокрема у разі хореї Гентінгтона (Матійців та ін., 2013). Гіперкінезія – це стан, що супроводжується надмірними аномальними або нормальними рухами, які виникають унаслідок порушення контролю локомоторної активності. Для з'ясування природи підвищеної рухливості особин необхідно провести додаткові поведінкові тести.

Таким чином, нами з'ясовано, що для формування мозкових структур у *D. melanogaster* необхідною є нормальна (оптимальна) експресія гена *Sod1* у гліюцитах. Як функціональний нокаут, так і надекспресія *Sod1* спричиняють нейродегенеративні зміни та появу фенотипу «вузької ламіни», які прогресують з віком. Вочевидь, зазначені зміни у мозку призводять до порушення параметрів поведінки і надмірної активності комах в процесі старіння.

Список літератури

- Вітушинська М.В., Матійців Н.П., Черник Я.І. Вплив тканинно-специфічної експресії генів супероксиддисмутази у клітинах мозку на чутливість до умов оксидативного стресу і життєздатність *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2015. – Т.49, №2. – С. 21–28. /Vitushins'ka M.V., Matiytsiv N.P., Chernyk Ya.I. Vplyv tkanyнно-spetsyfychnoi ekspresii geniv superoksyddysmutazy u klitynakh mozku na chutlyvist' do umov oksydatyvnoho stresu i zhittyezdatsnist' *Drosophila melanogaster* // Tsytologiya i genetyka. – 2015. – Т.49, №2. – С. 21–28./
- Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1991. – Т.29. – С. 3–250. /Vladimirov Yu.A., Azizova O.A., Deyev A.I. i dr. Svobodnyye radikaly v zhivyykh sistemakh // Itogi nauki i tekhniki. Ser. Biofizika. – 1991. – Т.29. – С. 3–250./
- Матійців Н.П., Могиляк І.І., Труш О.І., Черник Я.І. Рухова активність нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* // Вісник Одеського університету. Серія біологічна. – 2013. – Вип.2 (31). – С. 70–76. /Matiytsiv N.P., Mogylyak I.I., Trush O.I., Chernyk Ya.I. Rukhova aktyvnist' neyrodegeneratyvnykh mutantiv *Drosophila melanogaster* // Visnyk Odes'kogo universytetu. Seriya biologichna. – 2013. – Vyp.2 (31). – С. 70–76./
- Andersen J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? // Journal of Natural Medicines. – 2004. – Vol.10. – P. 18–25.
- Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual*. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 456p.

Chad M., Artymovych N., Makarenko O., Matiytsiv N. Effects of mitochondrin-2 on the dynamics of degeneration of brain tissues in *Drosophila* with an altered function of the *swiss cheese* gene // *Neurophysiology*. – 2014. – Vol.6. – P. 455–460.

Crapo J.D., Oury T., Rabouille C. et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Vol.89. – P. 10405–10409.

Dirrena E., Aebischer J., Rochat C. et al. SOD1 silencing in motoneurons or glia rescues neuromuscular function in ALS mice // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2015. – Vol.2. – P. 167–184.

Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs // *Journal of Natural Medicines*. – 2004. – Vol.10. – P. 1055–1063.

Tafari F., Ronchi D., Magri F. et al. SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis // *Cell. Neurosci*. – 2015. – Vol.9. – P.336.

Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // *Naturforsch.* – 1979. – Vol.34. – P. 143–147.

Apitz H., Salecker I. A challenge of numbers and diversity: neurogenesis in the *Drosophila* optic lobe // *Journal of Neurogenetics*. – 2014. – Vol.28 (3–4). – P. 233–249.

Jones W.D. The expanding reach of the GAL4/UAS system into the behavioral neurobiology of *Drosophila* // *BMB Rep.* – 2009. – Vol.42. – P. 705–712.

Представлено: О.М.Вайсерман, Я.П.Бобак / Presented by: A.M.Vaiserman, Ya.P.Bobak
Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova
Подано до редакції / Received: 15.03.2016

УДК: 575.89

Відсутність кореляційного зв'язку між рівнем радіоактивного забруднення та інфікованістю *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster* УкраїниН.В.Гора¹, Н.Д.Костенко¹, О.М.Майстренко², С.В.Серга¹, І.А.Козерецька¹¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ, Україна)² Університет Північної Дакоти (Фарго, США)

nazaragora@gmail.com

Визначено рівень інфікування ендосимбіонтом *Wolbachia* природних популяцій *Drosophila melanogaster* з радіоактивно забруднених та умовно чистих локалітетів України. Даний показник виявився нижчим у популяції з найбільш радіоактивно забрудненого локалітету (Янів; 13,5 мкЗВ/год), у порівнянні з іншими 6 дослідженими природними популяціями України (з локалітетів Поліське, Водойма-охолоджувач ЧАЕС, Чорнобиль, Київ, Варва, Умань). Кореляційний аналіз не показав зв'язку між рівнем інфікування *Wolbachia* та радіаційним фоном локалітетів, у яких було зібрано живий матеріал у період серпень-вересень 2014 року.

Ключові слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, природні популяції, радіоактивне забруднення.

Отсутствие корреляционной связи между уровнем радиоактивного загрязнения и инфицированностью *Wolbachia* в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины

Н.В.Гора, Н.Д.Костенко, О.М.Майстренко, С.В.Серга, И.А.Козерецкая

Определен уровень инфицирования *Wolbachia* природных популяций *Drosophila melanogaster* из радиоактивно загрязненных и условно чистых локалитетов Украины. Данный показатель оказался ниже в популяции из наиболее радиоактивно загрязнённого локалитета (Янов; 13,5 мкЗВ/год), по сравнению с другими 6 исследованными природными популяциями Украины (из локалитетов Полесское, Водоем-охладитель ЧАЭС, Чернобыль, Киев, Варва, Умань). Корреляционный анализ не показал связи между инфицированием *Wolbachia* и радиационным фоном локалитетов, в которых был собран живой материал в период август-сентябрь 2014 года.

Ключевые слова: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, природные популяции, радиоактивное загрязнение.

The lack of correlation between the level of radioactive contamination and infection with *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine

N.V.Gora, N.D.Kostenko, O.M.Maistrenko, S.V.Serga, I.A.Kozeretska

We analyzed *Wolbachia* infection rates in natural populations of *Drosophila melanogaster* from conditionally clean and contaminated localities in Ukraine. This parameter was lower in the most heavily contaminated locality (Janiv, 13.5 mSv/h) – 29.4% compared with the other 6 studied natural populations of Ukraine (from localities Poliske, Chernobyl NPP cooling pond, Chernobyl, Kyiv, Varva, Uman). We observed no correlation between *Wolbachia* infection rate and radiation background in the localities, where was collected samples in August-September 2014.

Key words: *Wolbachia*, *Drosophila melanogaster*, natural populations, radioactive contamination.

Вступ

Література містить низку даних щодо впливу радіаційного забруднення на живі організми та екосистему в цілому, отриманих після аварії на Чорнобильській атомній електростанції, яка відбулася у 1986 році (Möller, Mousseau, 2016). Багато досліджень були спрямовані на вивчення радіоактивного впливу на макроорганізми Чорнобильської зони відчуження (Mousseau, Möller, 2014). Але про ефект радіації в контексті симбіотичної асоціації організм-хазяїн та його мікробіота нічого не відомо. Такі взаємозв'язки можуть розглядатися в рамках хологеномної теорії еволюції, згідно з якою одиницею

природного добору є холобіонт (макроорганізм з усіма асоційованими з ним мікроорганізмами) та яка передбачає існування хологеному – сукупності генетичної інформації хазяїна та всіх його симбіонтів (Zilber-Rosenberg, Rosenberg, 2008). А отже, мікробіота може впливати на генетичні процеси в популяціях макроорганізмів. У цьому контексті особливий інтерес представляють так звані репродуктивні паразити, які успадковуються переважно трансваріально (по материнській лінії) і внаслідок різноманітних механізмів можуть забезпечувати своє розповсюдження в популяціях виду-хазяїна (Duron et al., 2008; O'Neil et al., 1997). Найбільш вивченою з таких бактерій є *Wolbachia*, яка інфікує більше 50% видів артропод (Weinert et al., 2015), включаючи *Drosophila melanogaster* (Серга, Козерецька, 2013). Таке поширення ендосимбіонта зумовлене мутуалістичними взаємостосунками з різними видами організмів-хазяїв або здатністю до репродуктивного паразитизму, під чим розуміють цитоплазматичну несумісність, перехід до партеногенезу, андроцид та фемінізацію (Stouthamer et al., 1999; Sun, Cline, 2009; Werren et al., 2008).

Як відомо, *D. melanogaster* є класичним модельним об'єктом, який протягом багатьох років досліджується і в контексті впливу радіаційного випромінювання на живі системи (Kohler, 1994). *Wolbachia* повсюдно інфікує природні популяції даного виду (Riegler et al., 2005), не викликаючи суттєвих модифікацій статевого розмноження, окрім низьких рівнів цитоплазматичної несумісності (Серга, Козерецька, 2013). Виявлена вона і в популяціях з високим рівнем радіаційного забруднення (Серга et al., 2014). Відомо, що *Wolbachia* інфікує клітини зародкового шляху, в яких безпосередньо відбуваються процеси, які призводять до спадкових змін. З одного боку, описані приклади підвищення життєздатності мутантних особин *D. melanogaster* за інфікування *Wolbachia*. Показано, що інфікування *Wolbachia* призводить до фенкопіювання норми за мутації у гені *Sxl* (відновлення фертильності у мутантних за цим геном особин) (Starr, Cline, 2002). З іншого боку, у деяких роботах продемонстровано, що інфікування штамом бактерії *wMel* пов'язано зі зниженням активності супероксиддисмутази (superoxide dismutase; SOD) (Wang et al., 2012), а присутність бактерії штаму *wRi* підвищує рівень пошкоджень ДНК у сперматоцитах іншого виду дрозофіли *Drosophila simulans* (Brennan et al., 2012). Такі результати можуть свідчити про посилення впливу мутагенів у присутності *Wolbachia*. Однак, вплив *Wolbachia* на організм-хазяїн за дії мутагенних чинників залишається далеким від розуміння, особливо за умов хронічного іонізуючого опромінення в природі.

Мета роботи полягала у з'ясуванні можливого зв'язку між частотою інфікування *Wolbachia* представників природних популяцій *D. melanogaster* України та рівнем радіоактивного забруднення територій, на яких мешкають останні, як можливого свідчення відповідних фенотипових ефектів бактерії.

Матеріали та методи

Збір живого матеріалу проводився польовою групою в період серпень-вересень 2014 року в 7 локалітетах України: Янів, Поліське, Водойма-охолоджувач ЧАЕС, Чорнобиль, Київ, Варва, Умань, перші чотири з яких знаходяться в Чорнобильській зоні відчуження (рис. 1). Фоновий рівень радіаційного забруднення визначався в місцях збору живого матеріалу за допомогою дозиметра Dosimeter-Radiometer MKS-05 «Terra-P» (табл.).

Представники природних популяцій *D. melanogaster* з відповідних локалітетів започаткували 203 ізосамкові лінії. З 10 особин-нащадків F1 кожної ізосамкової лінії за допомогою методу висолювання за стандартним протоколом здійснювалось виділення ДНК. Отримані зразки ДНК за допомогою ПЛР-аналізу перевірялися на наявність бактерії *Wolbachia*. Реакція проводилась з використанням специфічних праймерів (5'-CATACTATTTCGAAGGGATAG, 5'-AGCTTCGAGTGAACCCAAATTC) до фрагмента гена 16S рРНК довжиною 438 п.о. (O'Neill et al., 1992) за наступних умов: денатурація 3 хв. при 94°C, 40 циклів (денатурація 30 с/94°C, відпал праймерів 40 с/53°C, синтез 40 с/72°C), заключний синтез 4 хв. при 72°C. Реакція проводилась в суміші об'ємом 20 мкл (3 мкл ДНК, 2 мкл 10x ПЛР буфера («Thermo Scientific», США, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8 на 25°C), 500 mM KCl), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл 2 mM dNTP («Thermo Scientific», США), по 1 мкл 20 mM кожного праймера, 0,25 мкл Taq (5 од.акт/мкл, «Thermo Scientific», США), 9 мкл дистильованої води). Отримані продукти ПЛР візуалізували за допомогою горизонтального електрофорезу у 1%-му агарозному гелі в трис-боратній буферній системі.

Рівень інфікованості окремої природної популяції визначали відношенням інфікованих ліній до загальної кількості проаналізованих тієї ж популяції. Коефіцієнт кореляції рангів Спірмена (Spearman,

1904) застосували для пошуку кореляції між частотою інфікування та рівнем радіаційного забруднення. Розрахунки проводили в програмі R v.3.2.0 (R Core Team, 2015).

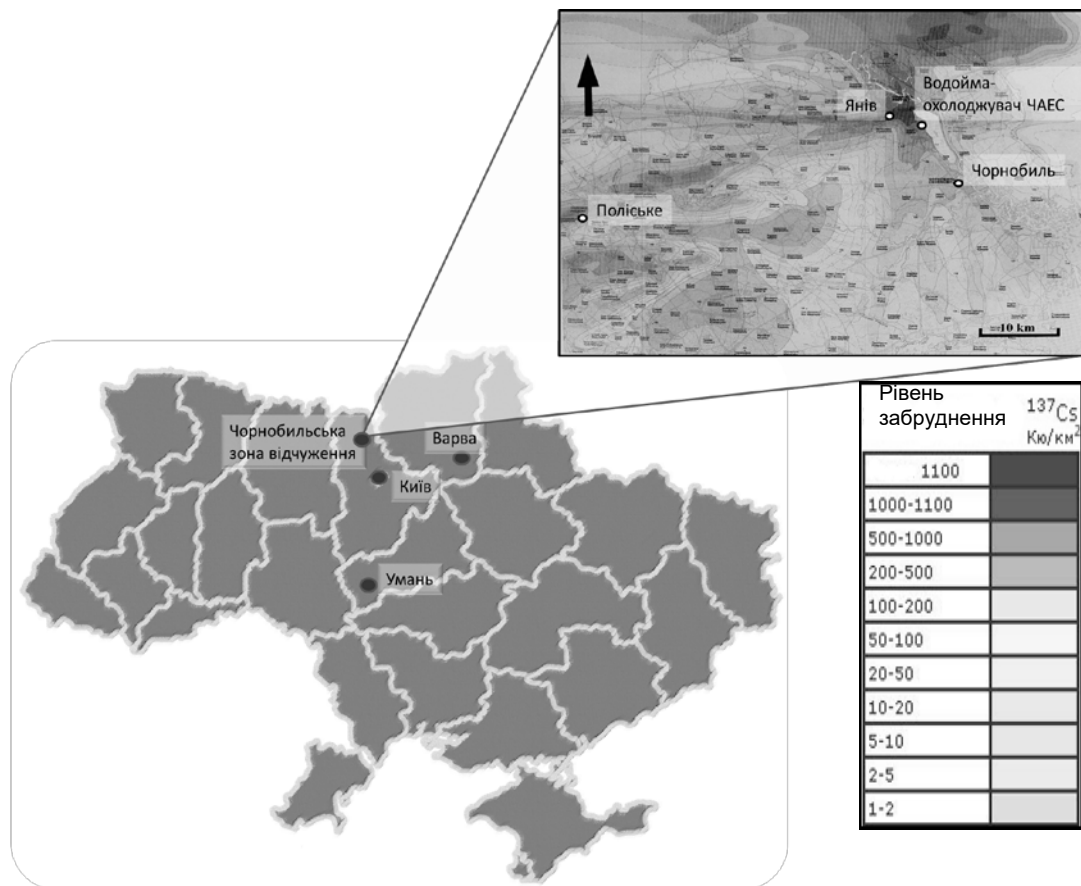


Рис. 1. Карта розташування локалітетів, в яких було зібрано природні популяції *D. melanogaster* в 2014 р. Вгорі представлена карта рівня радіаційного фону у Чорнобильській зоні відчуження (з <http://www.eurotrib.com>)

Результати та обговорення

Отримані рівні інфікованості ендосимбіонтом *Wolbachia* природних популяцій *D. melanogaster* України представлені в таблиці.

Рівень інфікованості в Янові, локалітеті з найвищим рівнем радіоактивного забруднення, достовірно нижчий, ніж в інших досліджених популяціях, включаючи умовно чисті (F, $p < 0,05$). Найвищий показник – в популяції з Києва, де фоновий рівень радіації в межах норми. Проте кореляційного зв'язку між рівнем радіаційного забруднення та інфікованістю ендосимбіонтом *Wolbachia* (коефіцієнт кореляції Спірмена $r_s = -0,5$, $n = 7$, $p = 0,2667$) (рис. 2) ідентифікувати не вдалося. Необхідно відзначити, що у зборах особин 2007 та 2008 років у зоні відчуження ЧАЕС у популяції з найвищим рівнем радіаційного фону (водойма-охолоджувач ЧАЕС – біля 20 мкЗв/год) у зразках ДНК, виділених з 25 особин з природної популяції, *Wolbachia* виявлена не була (Serga et al., 2014). Це може свідчити або про повну відсутність бактерії у популяції, або про дуже низький рівень інфікованості.

Згідно з отриманими результатами можна припустити, що інфікованість *Wolbachia* природних популяцій *D. melanogaster* при допороговому для нормальної життєдіяльності фоновому рівні радіації може обумовлюватися іншими механізмами, а при переході через порогове значення поширеність ендосимбіонта в природних популяціях плодової мухи знижується. На сьогоднішній день до кінця не зрозуміло, що саме визначає ту чи іншу частоту інфікованості бактерією природних популяцій *D. melanogaster*. Відома низка ефектів бактерії на пристосованість інфікованих особин, як наприклад, підвищення плодючості, резистентність до вірусних інфекцій, вплив на вибір партнера для

спаровування та інші (Серга, Козерецька, 2013). Проте жоден з вказаних ефектів не може до кінця пояснити широку поширеність бактерії та відмінність у рівнях інфікованості різних природних популяцій даного виду дрозофіли.

Таблиця.

Рівні інфікованості *Wolbachia* природних популяцій *D. melanogaster*

Популяція	Рівень радіаційного фону, мкЗв/год	Кількість проаналізованих ліній	Кількість інфікованих ліній	Рівень інфікованості, %
Варва	0,07	31	17	54,83 (36,03–72,68)*
Водойма-охолоджувач ЧАЕС	7	28	16	57,14 (37,18–75,54)*
Київ	0,13	36	23	63,89 (46,22–79,18)*
Умань	0,16	29	16	55,17 (35,69–73,55)*
Поліське	0,33	29	11	37,93 (20,69–57,74)*
Янів	13,5	34	10	29,41 (15,1–47,48)*
Чорнобиль	0,25	16	7	43,75 (19,75–70,12)*

Примітка: *в дужках вказано довірчий інтервал Клопера-Пірсона.

Отриманий результат є лише першим кроком у розумінні взаємовідносин симбіонтів та макроорганізмів у контексті впливу мутагенних факторів та адаптації до них. Потребуються подальші дослідження для виявлення механізмів таких ефектів та реальних наслідків інфікування бактеріями для організму-хазяїна та його природних популяцій за дії шкідливих факторів середовища. Крім того, залишається невирішеним питання про те, чи може інфікування певними бактеріями модифікувати частоти мутацій у виду-хазяїна або впливати на інші генетичні процеси.

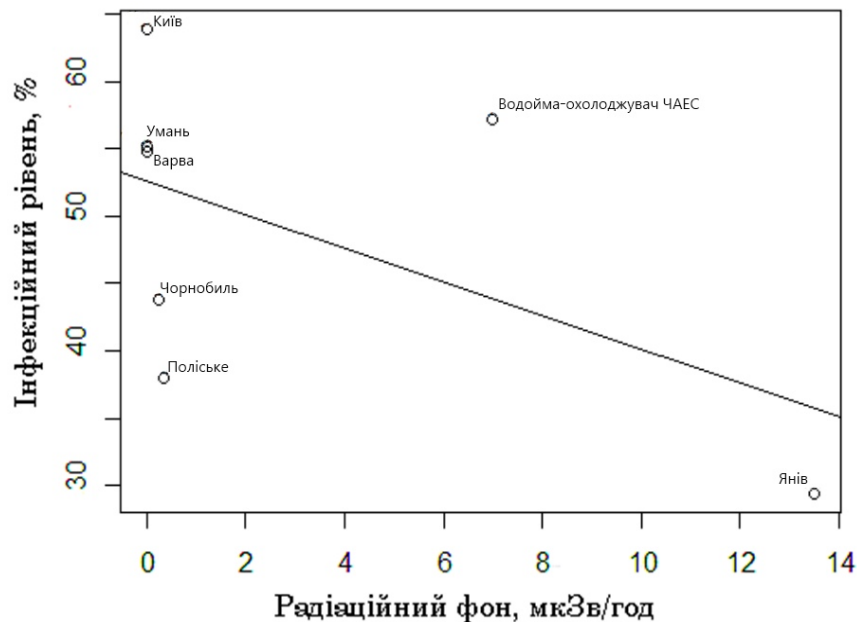


Рис. 2. Графік залежності рівня інфікованості від радіаційного фону місць збору особин

Отже, нами було визначено рівень інфікованості *Wolbachia* в природних популяціях *D. melanogaster* України з локалітетів з різним рівнем радіаційного забруднення. Виходячи з описаного вище, можна дійти висновку, що рівень інфікованості *Wolbachia* у досліджених популяціях *D. melanogaster* не залежить від рівня радіаційного забруднення, принаймні у зборах 2014 року. Однак

результат не заперечує існування особливих різноспрямованих взаємозв'язків між хазяїном та симбіонтом стосовно ефектів радіації.

Список літератури

- Serga S.V., Kozereckaya I.A. Zagadka rasprostraneniya *Wolbachia* v pryrodnykh populatsiyakh *Drosophila melanogaster* // Журнал общей биологии. – 2013. – Т.74, №2. – С. 99–111. /Serga S.V., Kozereckaya I.A. Zagadka rasprostraneniya *Wolbachia* v pryrodnykh populatsiyakh *Drosophila melanogaster* // Zhurnal obshchey biologii. – 2013. – Т.74, №2. – С. 99–111./
- Brennan L.J., Haukedal J.A., Earle J.C., Keddie B., Harris H.L. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans* // Insect Molecular Biology. – 2012. – Vol.21 (5). – P. 510–520. – doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x.
- Duron O., Bouchon D., Boutin S. et al. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone // BMC Biology. – 2008. – Vol.27 (6). – P. 1–12. – doi: 10.1186/1741-7007-6-27.
- Kohler R.E. Lords of the fly: *Drosophila* genetics and the experimental life. – Chicago: University of Chicago Press, 1994. – 344p.
- Möller A.P., Mousseau T.A. Are organisms adapting to ionizing radiation at Chernobyl? // Trends Ecol. Evol. – 2016. – doi: 10.1016/j.tree.2016.01.005.
- Mousseau T.A., Möller A.P. Genetic and ecological studies of animals in Chernobyl and Fukushima // Journal of Heredity. – 2014. – Vol.105 (5). – P. 704–709. – doi: 10.1093/jhered/esu040.
- O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M. et al. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol.89 (7). – P. 2699–2702.
- O'Neill S.L., Hoffmann A.A., Werren J.H. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. – Oxford University Press, Oxford – 1997. – 214p.
- Riegler M., Sidhu M., Miller W.J., O'Neill S.L. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster* // Curr. Biol. – 2005. – Vol.15 (15). – P. 1428–1433. – doi: 10.1016/j.cub.2005.06.069.
- R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<https://www.R-project.org/>)
- Serga S., Maistrenko O., Rozhok A. et al. Fecundity as one of possible factors contributing to the dominance of the wMel genotype of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila melanogaster* // Symbiosis. – 2014. – Vol.63 (1). – P. 11–17. – doi: 10.1007/s13199-014-0283-1.
- Spearman C. The proof and measurement of association between two things // Am. J. Psychol. – 1904. – Vol.15 (1). – P.72–101.
- Starr D.J., Cline T.W. A host parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects // Nature. – 2002. – Vol.418 (6893). – P. 76–79. – doi: 10.1038/nature00843.
- Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction // Ann. Rev. Microb. – 1999. – Vol.53. – P. 71–102. – doi: 10.1146/annurev.micro.53.1.7.
- Sun S., Cline T.W. Effects of *Wolbachia* infection and ovarian tumor mutations on Sex-lethal germline functioning in *Drosophila* // Genetics. – 2009. – Vol.181 (4). – P. 1291–1301. – doi: 10.1534/genetics.108.099374.
- Wang L., Zhou C., He Z. et al. *Wolbachia* infection decreased the resistance of *Drosophila* to lead // PLoS ONE. – 2012. – Vol.7 (3). – P. 1–7. – doi: 10.1371/journal.pone.0032643.
- Weinert L.A., Araujo-Jnr E.V., Ahmed M.Z., Welch J.J. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods // Proc. R. Soc. B Biol. Sci. – 2015. – Vol.282. – P. 3–8. – doi: 10.1098/rspb.2015.0249.
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology // Nature Reviews Microbiol. – 2008. – Vol.6 (10). – P. 741–751. – doi: 10.1038/nrmicro1969.
- Zilber-Rosenberg I., Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution // FEMS Microbiology Reviews. – 2008. – Vol.32 (5). – P. 723–735. – doi: 10.1111/j.1574-6976.

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: В.Ю.Страшнюк / Reviewer: V.Yu.Strashnyuk

Подано до редакції / Received: 15.03.2016

УДК: 575.21:575.224:595.773.4:539.1.047

Компоненти пристосованості у *Drosophila melanogaster* за впливу мікрохвильового опромінювання Л.Д.Дика, В.Ю.Страшнюк, Ю.Г.Шкорбатов

Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна (Харків, Україна)
lilya_dikaya@ukr.net

В лінії дикого типу Oregon-R *Drosophila melanogaster* досліджували вплив мікрохвильового випромінювання на прояв кількісних ознак і виникнення мутацій. Самців імаго опромінювали у віці двох діб (частота 36,64 ГГц, щільність потужності 0,01; 0,1 і 1 Вт/м², експозиція 10 с) і спарювали з неопроміненими самками. У двох наступних поколіннях досліджували ефекти опромінення за яйцепродукцією самок, часткою незапліднених яєць, частотою домінантних летальних мутацій, смертністю на стадії лялечки, кількістю нащадків імаго. За щільності потужності 0,01 Вт/м² суттєвих ефектів не спостерігали. За 0,1 Вт/м² збільшувалася частка незапліднених яєць. Яйцепродукція самок в поколінні Р була на рівні контролю, а в поколінні F₁ за щільності потужності 1 Вт/м² знижувалася. За кількістю нащадків імаго і лялечковою смертністю не виявлено значущого впливу опромінення у поколіннях F₁ і F₂. У нащадків F₁ за щільності потужності 1 Вт/м² виявлено ефект гормезису за рівнем домінантних леталей та часткою незапліднених яєць. У поколінні F₂ ефект змінювався на протилежний.

Ключові слова: НВЧ-випромінювання, дрозофіла, плодючість, домінантні леталі, лялечкова смертність, пристосованість.

Компоненты приспособленности у *Drosophila melanogaster* при воздействии микроволнового излучения Л.Д.Дикая, В.Ю.Страшнюк, Ю.Г.Шкорбатов

В линии дикого типа Oregon-R *Drosophila melanogaster* исследовали влияние микроволнового излучения на проявление количественных признаков и возникновение мутаций. Самцов имаго облучали в возрасте двух суток (частота 36,64 ГГц, плотность мощности 0,01; 0,1 и 1 Вт/м², экспозиция 10 с) и спаривали с необлученными самками. В двух следующих поколениях исследовали яйцепродукцию самок, долю неоплодотворенных яиц, частоту доминантных летальных мутаций (ДЛМ), смертность на стадии куколки, количество потомков имаго. При плотности мощности 0,01 Вт/м² существенных эффектов не наблюдали. При 0,1 Вт/м² увеличивалась доля неоплодотворенных яиц. Яйцепродукция самок в поколении Р была на уровне контроля, а в поколении F₁ при плотности мощности 1 Вт/м² снижалась. По количеству потомков имаго и куколочной смертности не выявлено значимого влияния облучения в поколениях F₁ и F₂. В потомстве F₁ при плотности мощности 1 Вт/м² обнаружен эффект гормезиса по частоте ДЛМ и доле неоплодотворенных яиц. В поколении F₂ эффект менялся на противоположный.

Ключевые слова: КВЧ-излучение, дрозофила, плодовитость, доминантные летали, куколочная смертность, приспособленность.

Fitness components in *Drosophila melanogaster* after the exposure to microwave radiation

L.D.Dyka, V.Yu.Strashnyuk, Yu.G.Shkorbatov

The effects of microwave radiation on the expression of quantitative traits and mutation emergence in wild type line Oregon-R in *Drosophila melanogaster* were investigated. Two-day-old males were exposed (frequency of 36.64 GHz, the power density of 0.01, 0.1 and 1 W/m², 10 seconds exposure) and then paired with non-irradiated females. The effects of radiation on egg production, portion of unfertilized eggs, frequency of dominant lethal mutations (DLM), pupal mortality and the number of offspring adults in two next generations were investigated. When the power density was 0.01 W/m² no significant effects were observed. When the power density was 0,1 W/m² the portion of unfertilized eggs increased. Egg production of the females in P generation was at the control level, and in the F₁ generation decreased at the power density of 1 W/m². No significant effects of irradiation on the number of offspring adults and pupal mortality were revealed in the F₁ and F₂ generations. At the power density of 1 W/m² hormesis effect was found in the F₁ generation by the frequency of DLM and the portion of unfertilized eggs. In the F₂ generation, the effect was reversed.

Key words: short-wave radiation, *Drosophila*, fertility, dominant lethal mutations, pupal mortality, fitness.

Вступ

Проблема впливу електромагнітних полів (ЕМП) на біологічні об'єкти привертає увагу в зв'язку зі збільшенням «електромагнітного забруднення» навколишнього середовища (Бецкий, 1994; Redlarski et al., 2015; Shckorbatov, 2014). Розвиток радіозв'язку, радіолокації, радіомовлення, телебачення, а також інших спеціалізованих систем передачі інформації та енергії призвів до підвищення загального рівня ЕМП різних частотних діапазонів, інтенсивності та режимів генерації в навколишньому середовищі. Широко впроваджується технологічне обладнання різного призначення, що використовує надвисокочастотне випромінювання, змінні та імпульсні магнітні поля, медичні терапевтичні та діагностичні установки, засоби візуального відображення інформації на електронно-променевих трубках (монітори, комп'ютери, телевізори тощо), промислове обладнання на електроживленні, електропобутові прилади, індивідуальні засоби зв'язку (мобільні телефони) тощо. На сьогодні можна констатувати посилення впливу електромагнітного випромінювання на живі організми. Всесвітня організація охорони здоров'я вважає цю проблему одною з найважливіших для людства (WHO, 1997).

Процеси взаємодії електромагнітних полів з живою клітиною, живим організмом досить складні і на даний час у повній мірі не досліджені. Відомо, що вплив мікрохвильового випромінювання може нести небезпеку для здоров'я. Міжнародне агентство з дослідження раку (IARC) класифікує радіочастотні електромагнітні поля як імовірно канцерогенні для людини (WHO/IARC, 2011). Дослідження на модельному об'єкті, яким є плодова мушка, актуальні з точки зору виявлення біологічної дії ЕМП. З огляду на генетичну безпеку особливий інтерес представляє дослідження наслідків мікрохвильового опромінення в ряду поколінь.

Метою роботи було дослідити вплив мікрохвильового опромінення на прояв кількісних ознак і виникнення мутацій у двох поколіннях *Drosophila melanogaster* Meig. У завдання роботи входило дослідити ефекти мікрохвильового опромінення у дрозофіли за такими компонентами пристосованості, як яйцепродукція самок, частка незапліднених яєць, частота домінантних летальних мутацій, смертність на стадії лялечки, кількість нащадків імаго.

Об'єкти та методи дослідження

У роботі використовували лінію дикого типу Oregon-R *Drosophila melanogaster* з колекції кафедри генетики і цитології Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна.

Мух вирощували на стандартному цукрово-дріжджовому живильному середовищі при температурі $24,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Культури дрозофіли розвивалися в стаканчиках об'ємом 60 мл. Обсяг живильного середовища в кожному стаканчику становив 10 мл.

Джерелом НВЧ-випромінювання служив випромінювач мікрохвильового діапазону, розроблений і сконструйований на кафедрі теоретичної радіофізики Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна на основі діода Гана (автор і розробник В.Н.Биков). Цей пристрій генерує ЕМП з частотою 36,64 ГГц.

Щільність потужності випромінювання задавали розташуванням об'єкта на певній відстані від джерела. Використовували три варіанти щільності: 0,01; 0,1 і 1 Вт/м², експозиція складала 10 секунд. Опромінювали самців імаго у віці 2-х діб, після чого їх спарювали з неопроміненими віргінними самками того ж віку. Компоненти пристосованості досліджували в потомстві опромінених мух. У контрольних варіантах експериментів опромінення мух не проводили.

Частота, яку застосовували у даній роботі (36,64 ГГц), належить до групи Ka (27–40 ГГц), що використовується в різних радіолокаційних системах (Richards, 2014), зокрема в поліцейських радарах. Згідно Michaelson (1980), мікрохвилі з інтенсивністю нижче 100 Вт/м² не виробляють суттєвого теплого ефекту.

Для визначення яйцепродукції віргінних самок тримали протягом трьох днів на стандартному середовищі, а потім схрещували протягом доби з триденними самцями, які напередодні були опромінені, і поміщали на чашки Петрі, заповнені цукрово-агаровим середовищем (на 100 мл дистильованої води – 3 г агар-агару і 5 г цукру) з тонким шаром дріжджової суспензії на поверхні. Через 8 годин підраховували кількість яєць, відкладених десятьма самками на кожній чашці Петрі.

Кількість нащадків імаго тісно корелює із загальною пристосованістю особин (Yamasaki, 1984). Визначали середній вихід імаго в потомстві однієї пари батьківських особин після семиденної яйцекладки.

Частоту домінантних летальних мутацій (ДЛМ) визначали за стандартною методикою (Тихомирова, 1990). Від самок у віці 4-х діб отримували кладки яєць на чашках Петрі. Через 8 годин

від початку експерименту підраховували число відкладених яєць, а ще через 48 годин враховували число нерозвинутих яєць, класифікуючи при цьому прозорі яйця як незапліднені, світлі матові – як ранні леталі (загибель сталася в перші 9 годин розвитку), темні – як пізні леталі (загибель сталася через 9 годин розвитку). Частоту домінуючих леталей визначали як відсоток нерозвинутих яєць від загальної кількості запліднених яєць. У дослідженні застосовували сліпий метод: варіанти досліду були зашифровані, і експериментатор не знав заздалегідь, який саме варіант він досліджує.

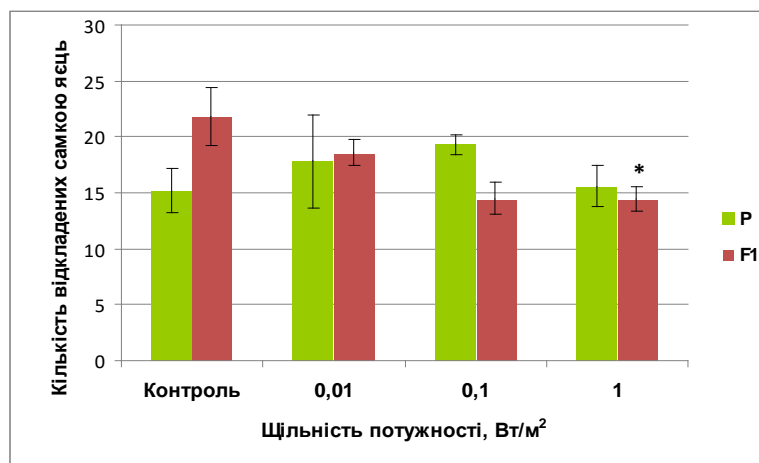
Про рівень постембріональної смертності судили за часткою нерозвинутих лялечок від загального їх числа у нащадків кожної пари мух.

Проведено 3 повторності досліду, результати яких, в основному, відтворювалися.

Проведено статистичний аналіз даних. Перевірку на нормальність розподілів визначали стандартними методами. Для параметричних ознак (яйцепродукція, кількість нащадків імаго) використовували дисперсійний аналіз. Значущість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Якісні ознаки (рівень ДЛМ, смертність на стадії лялечки) аналізували методом визначення часток, їх стандартної похибки. Достовірність відмінностей оцінювали за допомогою ф-перетворення і F-критерію Фішера. Силу впливу фактору визначали за допомогою дисперсійного аналізу за методом Плохинського (Атраментова, Утевская, 2008).

Результати

Плодючість організмів є важливою компонентою пристосованості. Результати дослідження впливу КВЧ-опромінення на яйцепродукцію самок дрозофіли при різній інтенсивності фактора (щільності потужності) представлені на рис. 1.



* – $p < 0,05$.

Рис. 1. Яйцепродукція самок в лінії Oregon-R *Drosophila melanogaster* після мікрохвильового опромінення

У самок батьківського покоління (P) не виявлено значущих змін за яйцепродукцією. У поколінні F₁ статистично значимий ефект мав місце після опромінення за щільності потужності 1 Вт/м², яйцепродукція самок знизилася на 33,9% щодо контролю ($p < 0,05$). При 0,01 і 0,1 Вт/м² значущого впливу ЕМП не виявлено.

На рис. 2 представлені дані про частку незапліднених яєць у двох поколіннях дрозофіли після КВЧ-опромінювання самців. У першому поколінні спостерігали двократне збільшення відсотка незапліднених яєць при щільності потужності 0,1 Вт/м², у потомків F₂ ефект не зберігався. За щільності потужності 1 Вт/м² досліджуваний показник у першому поколінні був у п'ять разів нижчий, ніж у контролі, тоді як у другому поколінні спостерігали протилежні зміни: частка незапліднених яєць збільшилася відносно контролю у 2,2 рази.

Отримані дані свідчать про те, що мікрохвильове опромінювання за певної інтенсивності може істотно впливати на відсоток незапліднених яєць, що, в свою чергу, може вносити певний вклад у репродуктивний потенціал дрозофіли.

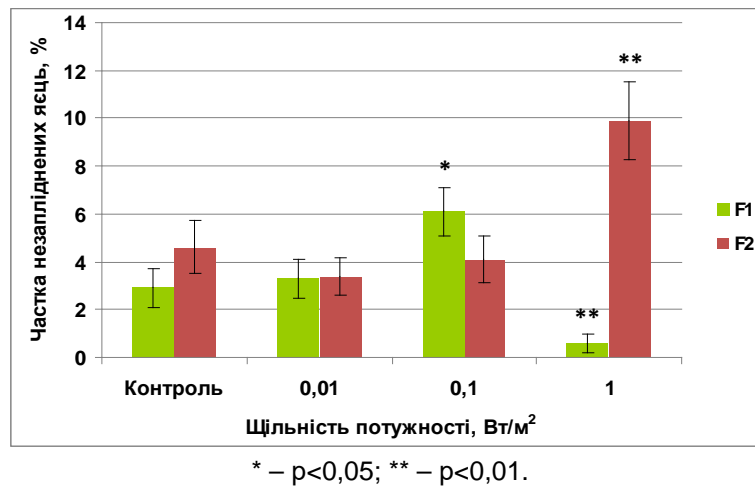


Рис. 2. Частка незапліднених яєць в лінії Oregon-R *Drosophila melanogaster* після мікрохвильового опромінювання

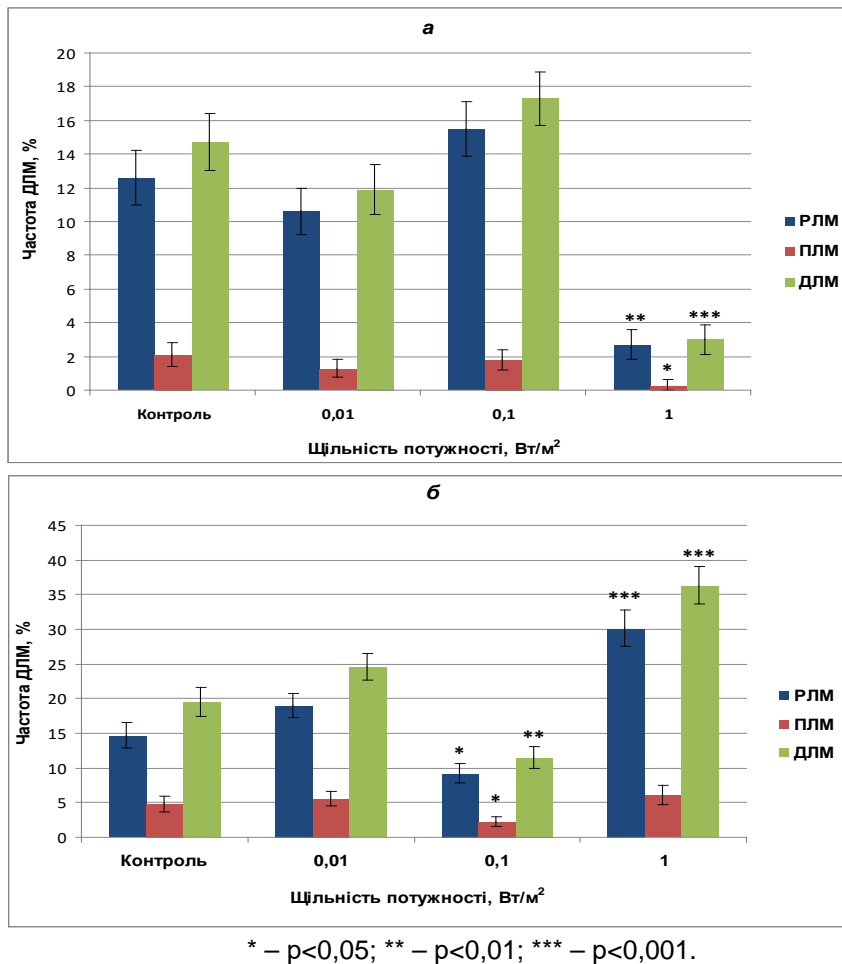


Рис. 3. Частота доміантних летальних мутацій в лінії Oregon-R *Drosophila melanogaster* після мікрохвильового опромінювання: а) у поколінні F₁; б) у поколінні F₂

Домінантні летальні мутації характеризують рівень ембріональної смертності, яка також є важливою компонентою загальної пристосованості. Дані про частоту ДЛМ у потомстві опромінених мух, включаючи ранні (РЛМ) і пізні (ПЛМ) леталі, наведено на рис. 3.

У першому поколінні за щільності потужності 0,01 і 0,1 Вт/м² значущих ефектів не виявлено. При 1 Вт/м² спостерігали істотне зниження рівня ранніх і пізніх леталей, загальний рівень ДЛМ при цьому зменшився в 5 разів ($p < 0,001$). Таким чином, у першому поколінні після мікрохвильового опроміювання за щільності потужності 1 Вт/м² мав місце ефект радіаційного гормезису. Можна говорити про те, що за даної інтенсивності НВЧ-опроміювання має генопротекторну дію.

У другому поколінні ефект не зберігався. Більше того, за щільності потужності 1 Вт/м² спостерігали зростання частоти РЛМ на 51,3% і сумарної ДЛМ на 46,3% ($p < 0,001$) щодо контролю. Вірогідно, це обумовлено зниженням тиску добору в першому поколінні після опромінення.

За щільності потужності 0,1 Вт/м² частота ранніх і пізніх леталей у нащадків F₂ була знижена в порівнянні з контролем, загальний рівень ДЛМ знизився на 40,0% ($p < 0,01$).

Кількість нерозвинених лялечок є показником постембріональної смертності. Дані про лялечкову смертність у двох поколіннях *D. melanogaster* після НВЧ-опроміювання представлені на рис. 4. Значущих змін даного показника відносно контролю не спостерігали ні в першому, ні в другому поколінні після опромінення.

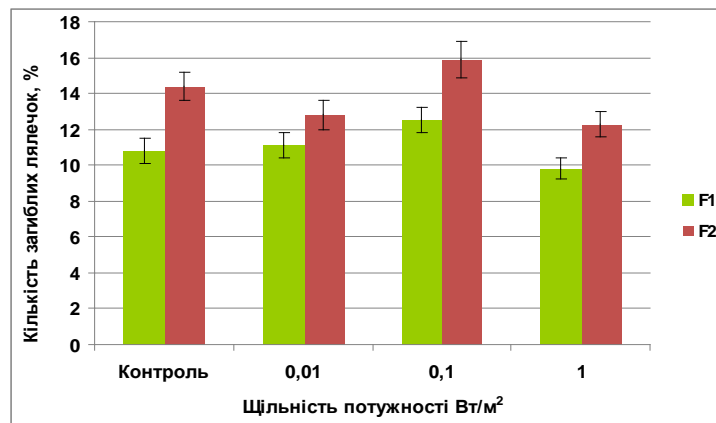


Рис. 4. Смертність на стадії лялечки в лінії Oregon-R *Drosophila melanogaster* після мікрохвильового опроміювання

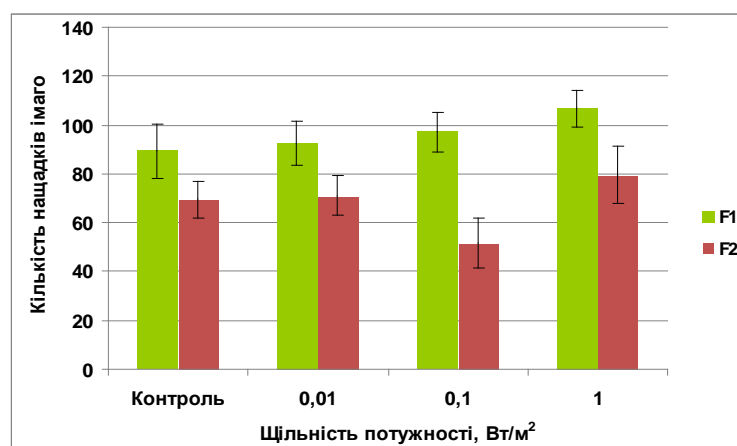


Рис. 5. Кількість нащадків імаго в лінії Oregon-R *Drosophila melanogaster* після мікрохвильового опроміювання

Кількість нащадків імаго залежить від плодючості батьківських особин і виживання нащадків на предімагінальних стадіях розвитку і є одним з інтегральних показників пристосованості (Yamasaki, 1984). Дані про вихід імаго в потомстві дрозофіли після НВЧ-опромінення представлені на рис. 5. Статистично значимого ефекту опромінення у нащадків F_1 і F_2 за даним показником не виявлено.

Таким чином, за щільності потужності $0,01 \text{ Вт/м}^2$ суттєвих ефектів НВЧ-опромінення за дослідженими ознаками не спостерігали. За щільності потужності $0,1 \text{ Вт/м}^2$ у першому поколінні після опромінення ефект було виявлено лише за часткою незапліднених яєць, яка була вища за контрольні значення. За щільності потужності 1 Вт/м^2 у поколінні F_1 за такими ознаками, як частка незапліднених яєць та рівень ембріональної смертності (ДЛМ), виявлено ефект гормезису. У другому поколінні ефект не зберігався, змінювався на протилежний. Яйцепродукція самок в поколінні Р була на рівні контролю, а в поколінні F_1 за щільності потужності 1 Вт/м^2 дещо знижувалася. За кількістю нащадків імаго і лялечковою смертністю не виявлено значущого впливу опромінення у поколіннях F_1 і F_2 .

Для оцінки сили впливу НВЧ-опромінення на досліджувані показники використовували дисперсійний аналіз однофакторних комплексів. Сила впливу фактора визначається як частка факторіальної мінливості в загальній мінливості ознаки (Атраментова, Утевская, 2008). Результати аналізу представлені в таблиці.

Таблиця.

Результати дисперсійного аналізу впливу мікрохвильового опромінювання на компоненти пристосованості у дрозофіли

Ознаки	Покоління після опромінення	Показники дисперсійного аналізу		
		h^2	F ϕ	p
Яйцепродукція самок	Р	14,9%	0,47	> 0,05
	F_1	63,2%	4,6	< 0,05
Частка незапліднених яєць	F_1	1,1%	6,7	< 0,05
	F_2	6,6%	38,3	< 0,001
Частота ДЛМ	F_1	2,1%	13,7	< 0,001
	F_2	4,3%	24,7	< 0,001
Смертність на стадії лялечки	F_1	0,1%	3,2	> 0,05
	F_2	0,2%	3,7	> 0,05
Кількість нащадків імаго	F_1	3,0%	0,7	> 0,05
	F_2	5,9%	1,4	> 0,05

Згідно з проведеними розрахунками, мікрохвильове опромінення не мало значущого впливу на яйцепродукцію самок батьківського покоління, лялечкову смертність та кількість нащадків імаго в обох досліджених поколіннях. У першому поколінні значущий вплив градацій фактору встановлено для яйцепродукції самок: статистична сила впливу становила $h^2=63,2\%$, для частки незапліднених яєць: $h^2=1,1\%$, для частоти ДЛМ: $h^2=2,1\%$. У другому поколінні значущий вплив опромінення виявлено за часткою незапліднених яєць, сила впливу становила – $h^2=6,6\%$, за рівнем ДЛМ: $h^2=4,3\%$.

Обговорення

Існує досить обширний матеріал про вплив ЕМП на різні компоненти пристосованості у дрозофіли, в тому числі про його генетичні наслідки. Треба відзначити, що результати, отримані різними авторами, часто суперечливі. Це можна пояснити різними умовами експериментів: частотними характеристиками поля, щільністю потужності, різною експозицією, стадією розвитку організмів, на якій проводився вплив.

У наших попередніх роботах було показано, що мікрохвильове випромінювання спричиняє значне зниження кількості нащадків у дрозофіли (Shskorbatov et al., 2003, 2004, 2007). Схожі ефекти мікрохвиль на плодючість дрозофіли були продемонстровані у роботах інших авторів (Atli, Unlu, 2006, 2007). За впливу електромагнітного поля з частотою 10 ГГц (3 год експозиції – 30-хвилинний інтервал – 3 год експозиції) середнє число нащадків було значно меншим, ніж у контролі (Atli, Unlu, 2006). Подібним чином, ЕМП з частотою 10 ГГц ($9,8 \text{ мВт/кг}$) знижувало плодючість у дрозофіли за показником яйцепродукції (Atli, Unlü, 2007).

Зниження фертильності у дрозозфіли при мікрохвильовому опроміненні з довжиною хвилі близько 7 мм спостерігали у роботі Залюбовської (1973); за довжини хвиль 5,5 і 8 мм ефекти були меншими.

На противагу цьому, згідно з Вайсброт та ін. (Weisbrot et al., 2003), за впливу мікрохвиль (1,900 МГц; 1,4 Вт/кг) протягом 10-денного періоду розвитку від часу відкладки яєць до стадії лялечки (60 хв об 11-й ранку і 60 хв о 4-й вечора щодня) збільшувалась чисельність потомства у дрозозфіли. Слід зазначити, що експериментальні умови в цій роботі були особливими. Зокрема, личинок дрозозфіли опромінювали мікрохвилями, коли вони перебували у живильному середовищі з високим вмістом води. Це, за нашою думкою, призводило до інтенсивного поглинання енергії мікрохвильового випромінювання живильним середовищем. Як наслідок, личинки отримували лише невелику частку від загальної мікрохвильової енергії.

Питання про можливість індукції мутацій у дрозозфіли мікрохвилями в науковій літературі є дискусійним. У нашій попередній роботі (Shkorbatov et al., 2007) було показано зростання частоти домінантних леталей, індукованих мікрохвильовим випромінюванням (35 ГГц, інтенсивність від 30 до 265 мкВт/см², експозиція 10 сек). В іншій роботі (Panagoropoulos et al., 2007) дрозозфіл опромінювали *in vivo* GSM 900 МГц (глобальна система мобільного телекомунікації) та DCS 1800 МГц (цифрова стільникова система) від цифрового мобільного телефону протягом декількох хвилин на день у перші 6 днів життя імаго. У клітинах опромінених мух на всіх етапах раннього та середнього оогенезу була виявлена індукована мікрохвилями фрагментація ДНК. Автори повідомили про зниження плодючості, що було пов'язано з дегенерацією великої кількості яйцевих камер (фолікулярних клітин, що живлять клітини і яйцеклітини).

Але інші дослідницькі групи не зареєстрували суттєвої мутагенної дії мікрохвиль. Марек та ін. (Marek et al., 1985) не виявили істотного впливу мікрохвильового випромінювання (частота 29, 98,5, 146,36 і 2375 МГц, експозиція – 5 хв, інтенсивність в діапазоні 15–25 Вт/см²) на частоту зчеплених зі статтю рецесивних летальних мутацій у дрозозфіли. У роботі (Hamnerius et al., 1985) було показано, що мікрохвилі з частотою 12 МГц та інтенсивністю до 20 Вт/кг не впливають на гени, що контролюють пігментацію очей у дрозозфіли.

Наші дані демонструють зниження ембріональної смертності та частки незапліднених яєць у першому поколінні мух після НВЧ-опромінення за щільності потужності 1 Вт/м², що може бути інтерпретовано як прояв ефекту гормезису. Однак у поколінні F₂ спостерігалось суттєве підвищення цих показників. Отримані результати свідчать про те, що, навіть за стимулюючої дії мікрохвильового опромінення у першому поколінні, його віддалені наслідки можуть мати зворотній характер.

Якщо торкатися механізмів дії ЕМП мікрохвильового діапазону на клітинному та молекулярному рівнях, то, як показано на різних типах клітин, вони здатні спричиняти пошкодження клітинних мембран (Cammaerts et al., 2011; Shkorbatov et al., 2011), викликати стрес-реакцію (Ennamany et al., 2008, Vijayaiahmi et al., 2014), індукувати окислювальний стрес (Yakumenko et al., 2015). Серед різноманітних каналів дії мікрохвиль на клітину важливу роль відіграє їхній вплив на клітинне ядро, про що свідчать дослідження електрокінетичних особливостей клітинних ядер і хроматину (Шахбазов и др., 1992). Зміни експресії генів під впливом мікрохвиль показані у роботах (Karaca et al., 2012; Nyland et al., 2009, Shakina et al., 2011, 2015).

Раніше нами було показано, що мікрохвильове опромінювання на стадії ембріогенезу (частота 36,64 ГГц, щільність потужності 1 Вт/м², експозиція 30 с) мало стимулюючий вплив на ендоредуплікацію в онтогенезі дрозозфіли: в слинних залозах 0-годинних передлялечок ступінь політенії хромосом збільшувалася в середньому на 7,5% (Дука et al., 2016). Цей результат теж можна розглядати як прояв ефекту гормезису, який у даному випадку проявлявся як посилення метаболічного потенціалу клітин.

Гормезис описується як стимуляція низькою дозою діючого фактору, який спричиняє гальмування у вищих дозах. Це загальнобіологічне явище, яке базується на стимуляції певних систем організму, активації захисних і репараційних систем клітин, що індукуються у відповідь на порушення гомеостазу (Mushak, 2007). Аналіз літератури відносно ефекту гормезису демонструє серйозні прогалини в науковому розумінні цього явища. За думкою різних авторів, обґрунтування гормезису залишаються спекулятивними. Емпіричні дані, призначені для тестування гормезису, обмежені. Немає достатніх узагальнень, особливо щодо механізмів, оцінки ризиків і віддалених наслідків подібних впливів. Всі ці питання є суттєвими, зокрема, з точки зору політики у галузі охорони здоров'я (Mushak, 2007; Roger, 1991).

Висновки

1. НВЧ-опромінення самців імаго (частота 36,64 ГГц, щільність потужності 0,01; 0,1 і 1 Вт/м²) не впливало на яйцепродукцію самок батьківського покоління. У поколінні F₁ достовірний ефект мав місце за щільності потужності 1 Вт/м²: яйцепродукція знизилася на 33,9%. Сила впливу фактору була на рівні 63,2%.

2. У поколінні F₁ після НВЧ-опромінення спостерігали двократне збільшення відсотка незапліднених яєць за щільності потужності 0,1 Вт/м², у потомків F₂ ефект не зберігався. За щільності потужності 1 Вт/м² досліджуваний показник у поколінні F₁ був у п'ять разів нижчий, ніж у контролі, тоді як у поколінні F₂ збільшувався відносно контролю у 2,2 рази. Сила впливу градацій фактору у нащадків F₁ становила 1,1%, в F₂ – 6,6%.

3. У поколінні F₁ після КВЧ-опромінювання не виявлено значущих змін рівня домінантних леталей у дрозофіли за щільності потужності 0,01 і 0,1 Вт/м². При 1 Вт/м² спостерігали істотне зниження рівня ранніх і пізніх леталей, загальний рівень ДЛМ зменшився в 5 разів. У нащадків F₂ за щільності потужності 0,1 Вт/м² частота РЛМ і ПЛМ була нижчою за контрольні значення, загальний рівень ДЛМ знизився на 40,0%. За щільності 1 Вт/м² спостерігали зростання частоти РЛМ на 51,3% і сумарної ДЛМ на 46,3%. Сила впливу фактору в поколінні F₁ становила 2,1%, в F₂ – 4,3%.

4. НВЧ-опромінювання не мало істотного впливу на лялечкову смертність та кількість нащадків імаго у двох поколіннях дрозофіли.

Список літератури

- Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. уч. зав. – Горловка: «Видавництво Ліхтар», 2008. – 248с. /Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statisticheskiye metody v biologii: uchebnyk dlya stud. vyssh. uch. zav. – Gorlovka: «Vydavnytsvo Likhtar», 2008. – 248s./
- Бецкий О.В. Электромагнитные миллиметровые волны и живые организмы // Биологические аспекты низкоинтенсивных миллиметровых волн. – М., 1994. – С. 8–38. /Betskiy O.V. Elektromagnitnyye millimetrovyye volny i zhivyye organizmy // Biologicheskiye aspekty nizkointensivnykh millimetrovykh voln. – M., 1994. – S. 8–38./
- Залюбовская Н.П. Реакция живых организмов на действие электромагнитных миллиметровых волн // Усп. физ. наук. – 1973. – Т.110. – С. 462–464. /Zalyubovskaya N.P. Reaktsiya zhivykh organizmov na deystviye elektromagnitnykh millimetrovykh voln // Usp. Fiz. Nauk. – 1973. – T.110. – S. 462–464./
- Тихомирова М.М. Генетический анализ. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280с. /Tikhomirova M.M. Geneticheskiy analiz. – L.: Izd-vo LGU, 1990. – 280s./
- Шахбазов В.Г., Шкорбатов Ю.Г., Грабина В.А. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на электрокинетические свойства хроматина и клеточных ядер // Молекулярная генетика и биофизика. – 1992. – №16. – С. 30–33. /Shakhbazov V.G., Shkorbatov Yu.G., Grabina V.A. Vliyanie elektromagnitnogo izlucheniya millimetrovogo diapazona na elektrokineticheskiye svoystva khromatina i kletochnykh yader // Molekulyarnaya genetika i biofizika. – 1992. – №16. – S. 30–33./
- Atli E., Ünlü H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the development of *Drosophila melanogaster* // International Journal of Radiation Biology. – 2006. – Vol.82. – P. 435–441.
- Atli E., Ünlü H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the fecundity of *Drosophila melanogaster* // Turk. Journ. Biol. – 2007. – Vol.31. – P. 1–5.
- Cammaerts MC, Debeir O, Cammaerts R. Changes in *Paramecium caudatum* (protozoa) near a switched-on GSM telephone // Electromagnetic Biology and Medicine. – 2011. – Vol.30 (1). – P. 57–66.
- Dyka L.D., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Shkorbatov Yu.G. Effects of 36,6 GHz and static magnetic field on degree of endoreduplication in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // International Journal of Radiation Biology. – 2016. – Vol.92, Issue 4. – P. 222–227.
- Ennamany R., Fitoussi R., Vie K. et al. Exposure to electromagnetic radiation induces characteristic stress response in human epidermis // Journal of Investigative Dermatology. – 2008. – Vol.128. – P. 743–746.
- Hamnerius Y., Rasmuson A., Rasmuson B. Biological effects of high frequency electromagnetic fields on *Salmonella typhimurium* and *Drosophila melanogaster* // Bioelectromagnetics. – 1985. – Vol.6. – P. 405–414.
- Karaca E., Durmaz B., Aktug H. et al. The genotoxic effect of radiofrequency waves on mouse brain // Journal of Neurooncology. – 2012. – Vol.106 (1). – P. 53–58.
- Marec F., Ondracek J., Brunnhofer V. The effect of repeated microwave irradiation on the frequency of sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster* // Mutation Research. – 1985. – Vol.157. – P. 163–167.

- Michaelson S.M. Microwave biological effects: an overview // Proceedings of the IEEE. – 1980. – Vol.68 (1). – P. 40–49.
- Mushak P. Hormesis and its place in nonmonotonic dose-response relationships: some scientific reality checks // Environmental Health Perspectives. – 2007. – Vol.115 (4). – P. 201–211.
- Nylund R., Tammio H., Kuster N., Leszczynski D. Proteomic analysis of the response of human endothelial cell line EA.hy926 to 1800 GSM mobile phone radiation // Journal of Proteomics & Bioinformatics. – 2009. – Vol.2 (10). – P. 455–462.
- Panagopoulos D.J., Chavdoula E.D., Nezis I.P., Margaritis L.H. Cell death induced by GSM 900-MHz and DCS 1800-MHz mobile telephony radiation // Mutation Research. – 2007. – Vol.626. – P. 69–78.
- Redlarski G., Lewczuk B., Żak A. et al. The Influence of electromagnetic pollution on living organisms: historical trends and forecasting changes // BioMed Research International. – 2015. – Article ID 234098.
- Richards M.A. Fundamentals of radar signal processing. – New-York et al.: McGraw-Hill Education, 2014. – 528p.
- Roger M. Macklis and Beverly Beresford // Radiation Hormesis. – J. Nucl. Med. – 1991. – Vol.32. – P. 350–359.
- Shakina L.A., Pasiuga V.N., Dumin O.M., Shkorbatov Yu.G. Effects of microwaves on the puffing pattern of *D. melanogaster* // Central European Journal of Biology. – 2011. – Vol.6 (4). – P. 524–530.
- Shakina L.A., Kolchigin N.N., Shkorbatov Y.G. Microwave irradiation and magnetic field effects on puffing pattern in *Drosophila melanogaster* // Advances in Cell Biology and Biotechnology. Abstract book. – Lviv, 2015. – P.20.
- Shkorbatov Y. The main approaches of studying the mechanisms of action of artificial electromagnetic fields on cell // Journal of Electrical & Electronic Systems. – 2014. – Vol.3 (2) – P.123.
- Shkorbatov Y.G., Evseeva M.V., Shakhbazov V.G. et al. Influence of the microwave radiation of different polarization state on transinactivation effect and viability of *Drosophila* // IV International Conference on Antenna Theory and Techniques. Sevastopol, 2003. – P. 823–824.
- Shkorbatov Y.G., Evseeva M.V., Shakhbazov V.G. et al. Transvection effect and viability of *Drosophila* under the influence of the microwave radiation // MSMW'04 Symposium Proceedings. The Fifth International Kharkov Symposium on Physics and Engineering of Microwaves, Millimeter, and Submillimeter Waves. – 2004. – P. 879–880.
- Shkorbatov Y., Pasiuga V., Shakina L. et al. *Drosophila melanogaster* viability and mutability under the influence of low energy microwave monochromatic and ultra wideband impulse field // 6-th International Conference on Antenna Theory and Techniques. – Sevastopol, 2007. – P. 289–291.
- Shkorbatov Y.G., Pasiuga V.N., Kolchigin N.N. et al. Cell nucleus and membrane recovery after exposure to microwaves // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. – 2011. – Section B, Vol.65 (672/673). – P. 13–20.
- Vijayalaxmi, Cao Y., Scarfi M.R. Adaptive response in mammalian cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields: A review and gaps in knowledge // Mutation Research – Review in Mutation Research. – 2014. – Vol.270. – P. 36–45.
- Weisbrot D., Lin H., Ye L. et al. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* // Journal of Cell Biochemistry. – 2003. – Vol.89. – P. 48–55.
- WHO/International Agency for Research on Cancer (IARC). – Press Release. – 2011. – No. 208, 31 May.
- WHO International EMF Project. 1997. (www.who.int/entity/peh-emf/en)
- Yakymenko I., Tsybulin O., Sidorik E. et al. Oxidative mechanisms of biological activity of low-intensity radiofrequency radiation // Electromagnetic Biology and Medicine. – 2015. – Vol.19. – P. 1–16.
- Yamasaki T. Measurement of fitness and its components in six laboratory strains of *Drosophila melanogaster* // Genetics. – 1984. – Vol.108. – P. 201–211.

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: О.В.Горенська / Reviewer: O.V.Gorenskaya

Подано до редакції / Received: 20.03.2016

УДК: 391.139:595.773.4:539.122.047

Продолжительность жизни в потомстве *Drosophila melanogaster* после острого γ -облучения

Д.А.Скоробагатько^{1,2}, В.Ю.Страшнюк¹, А.А.Мазиллов²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²ННЦ «Харьковский физико-технический институт» (Харьков, Украина)
 d_skorobagatko@bk.ru

Изучали продолжительность жизни (ПЖ) имаго *Drosophila melanogaster* в поколении F_1 после однократного острого облучения тормозными γ -квантами родительских особей. Материалом служила линия дикого типа Oregon-R. 3-суточных имаго облучали тормозными γ -квантами в дозах 8 Гр, 16 Гр и 25 Гр на линейном ускорителе электронов ЛУЭ-10. Облучённых (О) и необлучённых (К) мух скрещивали в четырёх различных комбинациях: К×К (контроль), О×К, К×О и О×О. Обнаруживаемые эффекты зависели от дозы облучения, пола облучаемых особей и пола потомков F_1 . Наиболее действенной была доза облучения 25 Гр, эффект имел место во всех вариантах облучения (О×К, К×О и О×О). При этом ПЖ потомков, как правило, увеличивалась, за исключением самок К×О, которые жили меньше контрольных мух. Статистическая сила влияния дозы облучения на ПЖ имаго в разных вариантах опыта составила 2,7–10,0 %, за исключением самок F_1 О×О, у которых значимого влияния дозы облучения на исследуемый признак не выявлено.

Ключевые слова: продолжительность жизни, ионизирующее облучение, дрозофила, потомство F_1 .

Тривалість життя в потомстві *Drosophila melanogaster* після гострого γ -опромінення

Д.О.Скоробагатько, В.Ю.Страшнюк, О.О.Мазілов

Вивчали тривалість життя (ТЖ) имаго *Drosophila melanogaster* в поколінні F_1 після однократного гострого опромінення гальмівними γ -квантами батьківських особин. Матеріалом служила лінія дикого типу Oregon-R. 3-денних имаго опромінювали гальмівними γ -квантами в дозах 8 Гр, 16 Гр і 25 Гр на лінійному прискорювачі електронів ЛПЕ-10. Опромінені (О) і неопромінені (К) мух схрещували в чотирьох різних комбінаціях: К×К (контроль), О×К, К×О і О×О. Виявлені ефекти залежали від дози опромінення, статі опромінені особин і статі нащадків F_1 . Найбільш дієвою була доза опромінення 25 Гр, ефект мав місце в усіх варіантах опромінення (О×К, К×О і О×О). При цьому ТЖ нащадків, як правило, збільшувалася, за винятком самок О×О, які жили менше контрольних мух. Статистична сила впливу дози опромінення на ТЖ имаго в різних варіантах дослідження складала 2,7–10,0 %, за винятком самок F_1 О×О, у яких значимого впливу дози опромінення на досліджувану ознаку не виявлено.

Ключові слова: тривалість життя, іонізуюче випромінювання, дрозофіла, потомство F_1 .

Lifespan in the progeny of *Drosophila melanogaster* after acute γ -irradiation

D.A.Skorobagatko, V.Yu.Strashnyuk, A.A.Mazilov

Lifespan (LS) of adults of *Drosophila melanogaster* in the F_1 generation after a single acute exposure of parents to bremsstrahlung γ -rays was studied. Wild-type stock Oregon-R was used as the material. 3-day-old adults were irradiated with bremsstrahlung gamma-rays at doses of 8 Gr, 16 Gr and 25 Gr using the electron linear accelerator LUE-10. Irradiated (I) and non-irradiated (C) flies were crossed in four different combinations: C×C (control), I×C, C×I, and I×I. The effects depended on the dose of radiation, sex of irradiated flies and F_1 offspring sex. The most effective dose was 25 Gr, the effect occurred in all exposure variants (I×C, C×I, and I×I). The LS usually increased, except for females I×I, who lived less than control flies. The statistical power of the influence of the radiation dose on the LS of adults in different variants of the experiment was 2,7–10,0 % except females F_1 I×I, in which no significant influence of the radiation doses on the investigated trait was revealed.

Key words: lifespan, ionizing radiation, *Drosophila*, F_1 generation.

Введение

К исследованию биологических эффектов ионизирующего излучения существует давний и непрекращающийся интерес. Одной из важных компонент приспособленности, по которой оценивают действие радиации, является продолжительность жизни (ПЖ) организмов. Дрозофила является одним

из классических объектов, на которых ведутся исследования на эту тему. Большинство работ посвящено изучению продолжительности жизни облученного поколения. Характер изменений данного признака зависит от стадии развития, на которой производилось воздействие, генотипа, способа облучения и характеристик излучения (Вайсерман и др., 2003; Baxter, Blair, 1969; Giess, 1980; Seong et al., 2011).

В то же время недостаточно изучены последствия радиации в потомстве облученных родителей. В последнее время наблюдается возрастающий интерес к исследованиям на эту тему (Голуб, Черник, 2008; Vaiserman et al., 2004). Обсуждается возможность участия эпигенетических факторов в изменении ПЖ у потомков родителей, подвергнутых различным видам стресса (Greer et al., 2011; Vaiserman, 2011, 2012), роль транспозиций мобильных генетических элементов (Голуб, Черник, 2008), действие цитоплазматических факторов (Clancy, 2008), в том числе эндосимбионтов (Maistrenko et al., 2015), и материнского эффекта (Fox et al., 2004).

Данные о последствиях облучения, полученные разными авторами, бывают противоречивы, что связано с комплексом условий, в которых проводились исследования. Зачастую в экспериментах используют источники излучения с определенной энергией γ -квантов. Использование тормозного спектра, представляющего собой набор γ -квантов разных энергий, более приближено к естественным условиям.

Цель работы – изучить изменения продолжительности жизни имаго дрозофилы в поколении F_1 после однократного острого облучения тормозными γ -квантами родительских особей. В задачи работы входило исследование зависимости эффекта от дозы, пола облученных родителей, а также определение силы влияния фактора облучения на исследуемый признак.

Объекты и методы исследования

В работе использовали линию дикого типа Oregon-R *Drosophila melanogaster* Meig. из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Мух выращивали на стандартной сахаро-дрожжевой питательной среде при температуре $24,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Культуры дрозофилы развивались в стаканчиках объемом 60 мл. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 10 мл.

В работе использовали дозы облучения 8 Гр, 16 Гр и 25 Гр. Виргинных самок и самцов имаго дрозофилы в возрасте 3-х суток подвергали облучению на линейном ускорителе электронов ЛУЭ-10. Облучение проводили тормозными γ -квантами, образующимися при взаимодействии электронного пучка с толстой алюминиевой мишенью. Энергия электронов составляла 9,4 МэВ, сила тока – 810 мкА, толщина алюминиевого конвертора – 38 мм. Мощность дозы в точке облучения была рассчитана с помощью детекторов Harwell Red 4034 (Harwell, Великобритания), определяющих поглощенную дозу, и составляла 0,4 Гр/с. Тормозной спектр с учетом геометрии эксперимента рассчитывался с помощью программного пакета GEANT 4. Тормозной спектр представлял собой кривую Бете-Гайтлера, где 97% энергий γ -квантов приходилось на энергии до 3 МэВ, в том числе 70% на энергии до 500 кэВ.

Облученных (О) и необлученных (К) мух скрещивали в четырех различных комбинациях: К×К (контроль), О×К, К×О и О×О.

ПЖ имаго оценивали в потомстве F_1 после облучения. В пробирки помещали по 30 особей, отдельно виргинных самок и самцов. Учет выживших мух проводили каждые 3 дня, при пересадке на свежую питательную среду. Проведено по 3 повторности в каждом варианте опыта.

Выполнен статистический анализ данных. Распределение по продолжительности жизни редко подчиняется нормальному закону (Крутько и др., 2002). В нашем случае оно также не нормально, что было определено с помощью стандартных методик (Гланц, 1998). Для анализа точечных параметров продолжительности жизни использовали критерий χ^2 . Для сравнения распределений в каждом варианте скрещивания использовали критерий Краскелла-Уоллеса с дальнейшим множественным сравнением с контролем, с использованием критерия Данна и непараметрического варианта критерия Ньюмена-Кейлса. В качестве точечных оценок использовали среднюю продолжительность жизни, ошибку среднего, медианную ПЖ и максимальную продолжительность жизни, время 90%-й гибели мух. Медианную ПЖ определяли, поскольку показатель средней ПЖ является очень чувствительным к случайным выбросам данных на концах распределения (Ермаков, Гаврилова, 1987). Также вычислялся непараметрический показатель силы влияния фактора (Атраментова, Утевская, 2008). Построены кривые дожития. Экспериментальные оценки интенсивности смертности (согласно уравнению

Гомперца, которое наиболее подходит для описания смертности у лабораторных животных) аппроксимировали функцией вида:

$$\mu(x) = Re^{\alpha x},$$

где x – продолжительность жизни, α и R – т.н. параметры смертности. Рост/снижение параметра α описывает наклон кривой выживания – ускорение/замедление старения наиболее долгоживущей части популяции. Вариация параметра R приводит к почти параллельному сдвигу кривой дожития для значительной части популяции, изменению длины здоровой жизнедеятельности до наступления дряхления. В случаях значительного изменения средней ПЖ и медианной ПЖ, при почти неизменной максимальной ПЖ, параметры α и R изменяются одновременно и разнонаправлено (Крутько и др., 2002). Следует учитывать, что модель Гомперца не применима для описания ранней смертности, поэтому мы аппроксимировали экспериментальные данные, начиная с 3-дневного возраста для вариантов $O \times K$ и $K \times O$, а также с 9-дневного для варианта $O \times O$. Точки начала отсчета были выбраны согласно (Promislow et al., 1999), где обосновывалось соответствие модели Гомперца экспериментальным кривым с порогового значения $\mu=1/N$.

Статистический анализ был проведен с использованием программ Microsoft Office Excel 2003, STATISTICA 6.0, Origin Pro 7.0. В работе принят уровень значимости не ниже $p \leq 0,05$.

Результаты

Данные о влиянии γ -излучения на продолжительность жизни имаго в потомстве облучённых и необлучённых мух представлены на рис. 1–3 и в табл. 1. В результате облучения самок ($O \times K$) с помощью теста Ньюмена-Кейлса показано влияние доз 25 Гр и 8 Гр на продолжительность жизни самок ($p < 0,01$) и доз 25 Гр и 16 Гр на продолжительность жизни самок F_1 ($p < 0,05$). У самцов отмечено снижение как средней, так и медианной ПЖ после доз облучения 8 Гр на 21,8% и 16,6% соответственно. Также наблюдали сокращение времени 90%-ой гибели у самцов данной группы ($p < 0,1$). Повышение средней ПЖ на 29,7%, медианной – на 45,7%, а также времени 90%-й гибели на 14,3% отмечено у самцов при дозе облучения 25 Гр. У самок под влиянием дозы 16 Гр было показано снижение средней ПЖ на 6%. После облучения в дозе 25 Гр у самок наблюдали увеличение времени 90%-ой гибели на 32,1% и увеличение медианной ПЖ на 16,4% ($p < 0,1$).

После облучения самцов ($K \times O$) средняя ПЖ самцов в потомстве F_1 возросла на 26,3% при дозе облучения 8 Гр и на 18,5% при дозах 16 и 25 Гр. Время 90%-ой гибели увеличилось по сравнению с контролем на 26,7–38,0 %, в зависимости от дозы. У самок F_1 при дозе облучения 8 Гр наблюдали увеличение медианной ПЖ на 15,7% и времени 90%-й гибели на 18,5%; облучение в дозе 25 Гр приводило к снижению этих показателей на 13,9% и 17,1% соответственно. Средняя ПЖ у самок 25 Гр уменьшилась на 18,6%.

В варианте с облучением обоих родителей ($O \times O$) в потомстве F_1 у самцов изменились параметры продолжительности жизни только в случае дозы 25 Гр. С высоким уровнем значимости произошло увеличение МПЖ на 12,6%, СПЖ – на 15,5%, а времени 90%-й гибели – на 6,7%. У самок F_1 увеличилось лишь время 90%-й гибели: после дозы 16 Гр на 5,9%, а после дозы 25 Гр – на 10,3%.

Таким образом, при дозе 8 Гр действие радиации было угнетающим при облучении самок родительского поколения: ПЖ самцов $O \times K$ снижалась. При облучении самцов ($K \times O$) обнаружен стимулирующий эффект в потомстве обоего пола. Действие дозы 16 Гр было эффективным только при облучении самцов ($K \times O$): имело место повышение ПЖ у самцов F_1 . Наиболее действенной была доза облучения 25 Гр, эффект имел место во всех вариантах облучения ($O \times K$, $K \times O$ и $O \times O$). При этом ПЖ потомков, как правило, увеличивалась, за исключением самок $K \times O$, живших меньше контрольных мух. Наименее эффективным было облучение обоих родителей (вариант $O \times O$): ПЖ у потомков обоего пола была выше контрольных значений только при максимальной применённой дозе – 25 Гр.

В табл. 2 приведены данные о статистической силе влияния дозы облучения на ПЖ потомков облучённых родителей. Сила влияния фактора по Фишеру определяется как доля факториальной изменчивости в общей изменчивости признака (Атраментова, Утевская, 2008). Расчеты показали, что сила влияния дозы облучения на продолжительность жизни имаго в потомстве F_1 составила 2,7–10,0 %, в зависимости от пола облучаемых родительских особей и пола потомков. Сила влияния облучения на ПЖ потомков в вариантах $O \times K$ и $O \times O$ была выше у самцов F_1 . В варианте $K \times O$ сила влияния фактора у самок и самцов F_1 была примерно равной. У самок F_1 при облучении обоих родителей (вариант $O \times O$) значимого влияния дозы облучения на исследуемый признак не выявлено ($\eta^2=1,2\%$, $p > 0,05$).

Обсуждение

Для объяснения механизмов старения и дифференциальной продолжительности жизни организмов предложен ряд теорий и гипотез. Теория накопления соматических мутаций объясняет старение накоплением ошибок на уровне ДНК в ходе онтогенеза (Виленчик, 1970; Medawar, 1946). Согласно свободно-радикальной теории, старение происходит благодаря накоплению в клетке повреждений, вызванных окислительным стрессом от свободных радикалов (Hargan, 2009). В соответствии с теорией антагонистической плейотропии отбор по признакам, обеспечивающим выгоду на ранних этапах жизни, оборачивается негативными эффектами в позднем периоде (Williams, 1957). Теория запрограммированной смерти предполагает наличие специальной программы смерти организма для стабилизации популяции и быстрой смены поколений, осуществляемой с помощью апоптоза, который запускается самоликвидацией митохондрий (Скулачев, 1997). Согласно митохондриальной теории существенный вклад в старение вносят митохондриальные мутации и их распределение в цитоплазме, что влияет на энергетику клетки (Linnane et al., 1989). В последнее время быстро набирает вес эпигенетическая теория старения, признающая ведущую роль в процессе старения неадаптивных эпигенетических изменений (Moskalev et al., 2014). В той или иной мере каждая из этих теорий может быть использована при объяснении вызванных действием радиации изменений продолжительности жизни организмов.

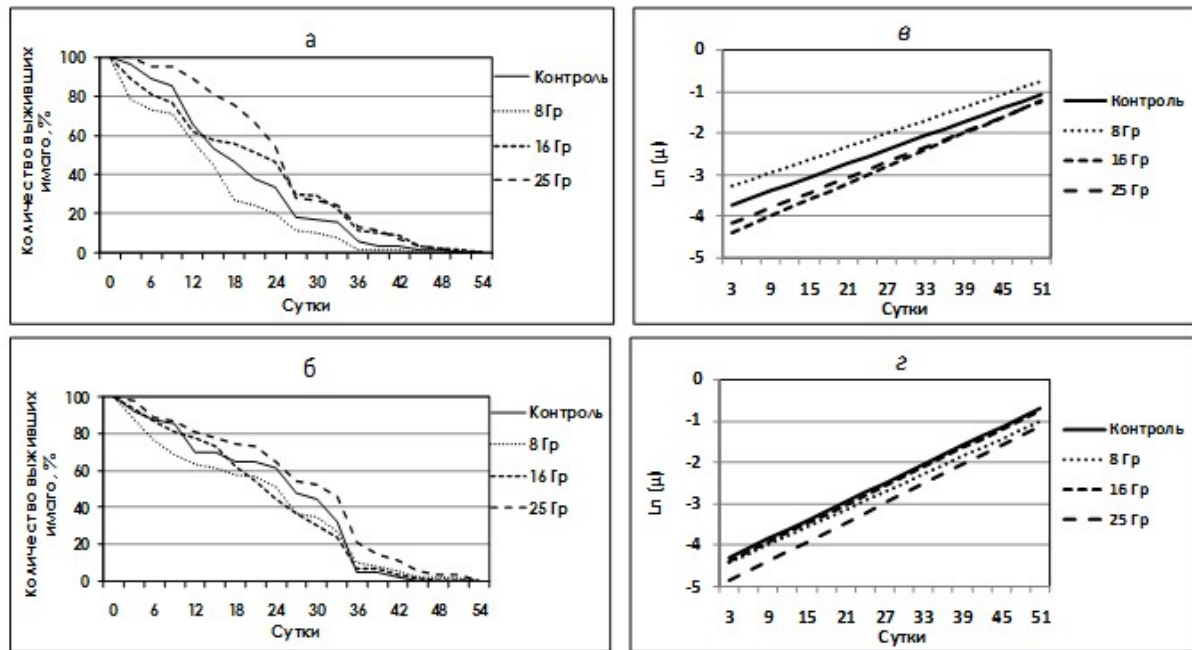


Рис. 1. Кривые выживания (а, б) и аппроксимация интенсивности смертности (в, г) имаго *D. melanogaster* в поколении F₁ после γ -облучения самок (вариант O x K): а, в – самцы; б, г – самки

Продолжительность жизни в ряду поколений непостоянна и носят колебательный характер, как было показано в работе (Izmaylov, Obukhova, 2003). Причем изменения не связаны с перераспределением долго- и короткоживущих особей в популяции. Эту закономерность подтверждают наши данные, демонстрирующие различия по ПЖ имаго линии Oregon-R в контроле в различных вариантах скрещиваний, которые проводились в разное время. Подобные вариации признака могут быть обусловлены как эндогенными факторами, например, дрейфом генов, эпигенетической модификацией генной активности, так и внешними: изменениями атмосферного давления, геомагнитной активности и другими неучтенными факторами (Izmaylov et al., 2005; Moskalev et al., 2014; Vaiserman, 2012).

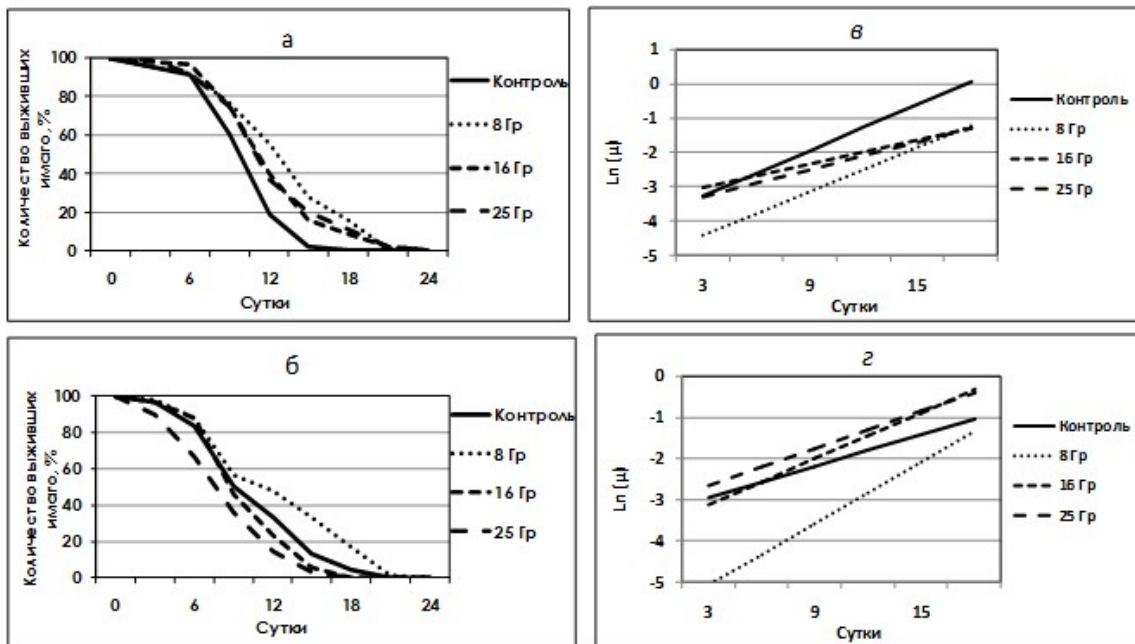


Рис. 2. Кривые выживания (а, б) и аппроксимация интенсивности смертности (в, г) имаго *D. melanogaster* в поколении F₁ после γ -облучения самцов (вариант К×О): а, в – самцы; б, г – самки

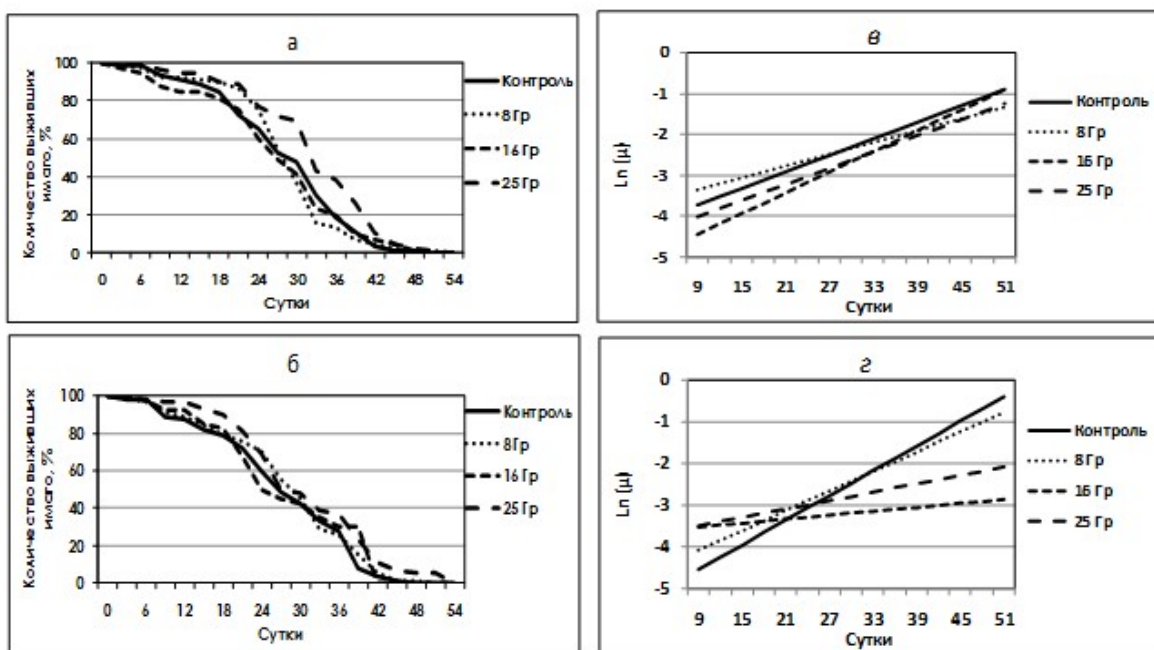


Рис. 3. Кривые выживания (а, б) и аппроксимация интенсивности смертности (в, г) имаго *D. melanogaster* в поколении F₁ после γ -облучения обоих родителей (вариант О×О): а, в – самцы; б, г – самки

Согласно Arking (2015), существуют различные варианты изменений параметров продолжительности жизни животных при разных внешних воздействиях: согласованный сдвиг как средней, так и максимальной ПЖ; вариация средней при неизменной максимальной ПЖ; или

изменение максимальной при неизменной средней ПЖ. Продолжительность жизни базируется на многоплановой генетической архитектуре, разный возраст имаго регулируется своим набором генов. Предполагается, что различные стимулы могут привести к альтернативным формам экспрессии генов, что вызывает появление трех фенотипов долголетия путем изменения паттерна экспрессии генов, отвечающих за поддержание периода активного функционирования, и/или паттерна экспрессии генов, характеризующих период дряхления. Графически это выражается в изменении наклона и/или сдвигами кривой выживания, или линии логарифма интенсивности смертности. Описываются подобные изменения вариацией параметров α и R из модели Гомперца.

Таблица 1.

Влияние γ -облучения родительского поколения на продолжительность жизни имаго в поколении F_1 у *D. melanogaster*

Варианты опыта	Доза облучения	Пол	Продолжительность жизни имаго, сутки				α	R
			Медианная	Средняя	Время 90%-й гибели	Максимальная		
О×К	Контроль	♂	17,5	20,2±1,1	35,7	51	0,06	0,0201
		♀	27,5	24,9±1,3	33,0	45	0,08	0,0107
	8 Гр	♂	14,6*	15,8±1,1*	31,0	45	0,05	0,0328
		♀	25,2	22,5±1,5	37,0	54	0,07	0,0097
	16 Гр	♂	22,8	22,1±1,5	40,0	54	0,07	0,0102
		♀	23,3	23,4±1,3*	36,4	48	0,08	0,0099
	25 Гр	♂	25,5**	26,2±1,1**	40,8*	51	0,06	0,0130
		♀	32,0	28,7±1,4	43,6**	54	0,08	0,0062
К×О	Контроль	♂	10,7	11,0±0,3	14,6	18	0,22	0,0195
		♀	10,0	11,4±0,3	17,1	21	0,13	0,0354
	8 Гр	♂	13,6*	13,9±0,4**	20,2*	24	0,21	0,0063
		♀	12,3*	13,2±0,5	20,3**	24	0,25	0,0030
	16 Гр	♂	12,1*	13,1±0,4**	18,5*	24	0,12	0,0348
		♀	9,7	10,8±0,3	13,6*	18	0,19	0,0250
	25 Гр	♂	11,9*	13,1±0,4*	19,4*	24	0,14	0,0242
		♀	8,6**	9,3±0,4**	14,2*	18	0,15	0,0444
О×О	Контроль	♂	29,5	28,8±1,0	40,4	51	0,07	0,0123
		♀	27,7	27,9±1,2	39,7	48	0,10	0,044
	8 Гр	♂	28,8	28,8±0,9	38,5	54	0,05	0,0230
		♀	29,7	28,9±1,1	41,7	51	0,08	0,0086
	16 Гр	♂	27,7	27,6±1,1	40,0	51	0,08	0,0055
		♀	25,0	28,5±1,7	42,0*	42	0,02	0,0252
	25 Гр	♂	33,2**	33,2±1,0**	43,1**	54	0,07	0,0100
		♀	28,0	31,5±1,1	43,8*	54	0,03	0,0221

Примечание: отличия от контроля достоверны: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$.

В нашем эксперименте мы наблюдаем реакции разных типов в зависимости от пола родителей и потомков. Из рис. 1–3 видно, что в варианте О×К есть тенденция к параллельному сдвигу функции интенсивности смертности (изменению параметра R) у потомков F_1 обоих полов. В варианте К×О

происходит как сдвиг, так и разнонаправленное изменение угла наклона графика функции (изменение параметра α) у особей разного пола. В варианте ОхО мы наблюдаем тенденцию к сдвигу у самцов и выраженное изменение наклона, несколько компенсированное сдвигом, у самок. При облучении одного из полов (варианты ОхК и КхО) мы наблюдали более выраженные изменения параметров ПЖ потомства по сравнению с результатом облучения обоих родителей (вариант ОхО). Сила влияния фактора радиации, как видно из таблицы, в данном случае снижена у самцов F_1 , а у самок вообще недостоверна на принятом уровне значимости.

Если проанализировать работы направления, сходного с нашим исследованием, то можно отметить следующее. В работе (Izmaylov et al., 1993) зафиксированы разнонаправленные изменения ПЖ в ряду поколений после γ -облучения. Особенностью данного исследования было то, что авторы применяли разные дозы к самцам и самкам родительского поколения.

Таблица 2.
 Статистическая сила влияния дозы облучения на продолжительность жизни потомков F_1

Варианты опыта	ОхК		КхО		ОхО	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Пол имаго в поколении F_1						
η^2	10,0%	2,7%	6,1%	7,2%	5,0%	1,2%
χ^2	35,9	9,6	22,0	25,7	17,8	3,6
p	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	> 0,05

В исследовании ПЖ имаго мутантных линий, полученных в результате острого рентгеновского облучения самцов дозами 10 и 30 Гр, показано, что подавляющее большинство из этих линий характеризуются пониженными показателями ПЖ (Голуб, Черник, 2008).

В работе (Vaiserman et al., 2004), в результате облучения яиц в малых дозах (в диапазоне 0,25–1 Гр), наблюдали эффект гормезиса по продолжительности жизни, как в облученном поколении, так и у их потомков.

Зона гормезиса при исследовании ПЖ у дрозофилы для разных популяций различна, однако можно найти такую зону для отдельных линий и для особей разного пола (Sagup, Loeschcke, 2011). Это означает, что кривая «доза-эффект» является более информативной для выявления эффекта гормезиса, чем одна определенная доза, которая может не попадать в горметическую зону для конкретного пола или генотипа.

Известно, что в области малых и средних стрессов, например, облучения, может наблюдаться несколько волн на кривой «доза-эффект». Согласно Зайнуллину (1997), это объясняется активацией, в зависимости от дозы, различных защитных механизмов – системы защиты от свободных радикалов, репарации, изменением активности метаболизма и др. В работе (Москалев и др., 2006) с использованием доз 10 и 30 Гр при облучении обоих полов в некоторых линиях наблюдали как понижение, так и повышение параметров ПЖ, эффект зависел от генетического фона линии.

Эффект гормезиса – не единственное возможное объяснение, когда речь идет об увеличении ПЖ потомков после облучения родителей. В нашем предыдущем исследовании (Скоробагатько и др., 2015а) при γ -облучении самок родительского поколения в дозах 16 и 25 Гр мы наблюдали зависимое от дозы увеличение частоты доминантных леталей в линии Oregon-R, так же как и в линии Var (Скоробагатько и др., 2015б). Повышение уровня эмбриональной смертности коррелировало с увеличением продолжительности жизни потомков имаго, что свидетельствовало о возможном действии отбора на увеличение жизнеспособности в потомстве облученных мух. Летальное и рекомбиногенное действие ионизирующего излучения показано многими авторами (Бобак, Черник, 2000; Голуб, Черник, 2008; Моссэ, 1990; Скоробагатько и др., 2015б). Увеличение продолжительности жизни мух под влиянием радиации показано также для линий дрозофилы, полученных из природных популяций, обитающих на территориях с различным уровнем радиационного загрязнения (Филиппоненко и др., 2009).

В работе (Izmaylov et al., 1993) показано, что однократное облучение обеих родительских особей приводит к увеличению параметров ПЖ в первом поколении, как и в нашем случае. Несколько повышенная эмбриональная смертность слабо коррелировала с изменением ПЖ и, как считают авторы, она не является определяющим фактором в радиационно-индуцированном изменении ПЖ

потомков. По мнению авторов, увеличение ПЖ в первых постоблученных поколениях является не настоящим стимулированием, а изменением ритма природных колебаний ПЖ.

Согласно Москалёву и др. (Moskalev et al., 2011), при воздействии малых доз хронической радиации, в формирование радиобиологических эффектов на уровне организма, к которым относится изменение ПЖ, вовлечены сенсоры (ATM, ATR), трансдукторы (SIRT1, JNK, p53, FOXO) и эффекторы (ATG7, ATG8a) клеточной системы передачи стрессовых сигналов. В случае острого облучения (30 Гр) была показана важность систем ATM, ATR и p53.

Наблюдаемые половые различия в реакции на облучение в потомстве F₁, по-видимому, являются отражением дифференциальной жизнеспособности полов (Никольченко, 1988). В основе этого лежат генетические различия, в данном случае – гетерогаметность мужского пола (Haldane, 1922; Huxley, 1924), а также физиологические особенности, в частности, различия в уровне основного обмена (MacArthur, Baillie, 1926; Riddle, 1931).

Продолжительность жизни у дрозофилы зависит от работы многих генов, генетических и эпигенетических механизмов, большинство из которых связано с ответом организма на стресс (Moskalev et al., 2014). Облучение изменяет экспрессию существенной доли генов в геноме дрозофилы, в том числе генов, влияющих на продолжительность жизни (Seong et al., 2011). Известно, что некоторые гены стресс-ответа имеют разный уровень экспрессии у особей дрозофилы разного пола. В работе (Waskar et al., 2009) обнаружено, что нормальная работа гена p53 после облучения взрослых мух в дозе 900 Гр вызывает увеличение выживаемости самцов и уменьшение выживаемости самок, по сравнению с нулевыми мутантами. Одним из объяснений антагонистической плеiotропии данного гена является то, что он может регулироваться геном *MOF*, который находится в X-хромосоме и, соответственно, у разных полов находится разная доза данного гена. Авторы предполагают, что ген p53 имеет пороговый эффект относительно выживаемости в стрессовых условиях, и порог для перехода от благоприятного влияния к угнетающему, которые зависят от стресса и пола.

В работе (Moskalev et al., 2011) показано, что деацетилаза SIRT1 и JNK киназа, вовлеченные в радиобиологический ответ на уровне целого организма через модуляцию активности транскрипционного фактора FOXO, играют важную роль в различиях радиобиологического ответа у особей разного пола.

В работе (Wayne et al., 2007) были определены полоспецифические различия в режиме наследования транскриптома. Было обнаружено, что у самцов изменение экспрессии генов обусловлено главным образом аддитивным взаимодействием аллелей, тогда как у самок генная экспрессия изменяется в основном благодаря неаддитивным (эпистатическим) взаимодействиям между аллелями. В основе этих различий был показан существенный эффект X-хромосомы. Изменение ПЖ также затрагивается эпистатическими взаимодействиями (Paaby, Schmidt, 2009).

Половые различия в условиях стресса проявляются также в метаболизме экдистероидов, ювенильного гормона и биогенных аминов: октопамина и дофамина, играющих важную роль в стресс-реакции у насекомых (Раушенбах и др., 2000, 2001).

Выводы

В работе показано влияние острого облучения имаго тормозными γ -квантами в дозах 8–25 Гр на продолжительность жизни имаго *Drosophila melanogaster* в потомстве F₁. Обнаруживаемые эффекты зависели от дозы облучения, пола облучаемых особей и пола потомков F₁. Наиболее действенной была доза облучения 25 Гр, эффект имел место во всех вариантах облучения (O×K, K×O и O×O). При этом продолжительность жизни потомков, как правило, увеличивалась, за исключением самок K×O, которые жили меньше контрольных мух. Статистическая сила влияния дозы облучения на продолжительность жизни имаго в разных вариантах опыта составила 2,7–10,0 %, за исключением самок F₁ O×O, у которых значимого влияния дозы облучения на исследуемый признак не выявлено.

Список литературы

- Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. зав. – Горловка: «Видавництво Ліхтар», 2008. – 248с. /Atramentova L.A., Utevskaia O.M. Statisticheskiye metody v biologii: uchebnik dlya stud. vyssh. zav. – Gorlovka: «Vydavnytstvo Likhtar», 2008. – 248s./
- Бобак Я.П., Черник Я.І. Індукція рентгенівським опроміненням мутабільності генів X-хромосоми у ліній *lozenge Drosophila melanogaster* // Вісник Львівського ун-ту. – Сер. біол. – 2000. – №25. – С. 33–41. /Bobak Ya.P., Chernik Ya.I. Induktsiya rentgeniv's'kym oprominennyam mutabil'nosti geniv X-khromosomy u liniy *lozenge Drosophila melanogaster* // Visnyk L'viv's'kogo un-tu. – Ser. biol. – 2000. – №25. – S. 33–41./

- Вайсерман А.М., Литошенко А.Я., Квитницькая-Рыжова Т.Ю. и др. Молекулярные и клеточные аспекты радиационного гормезиса у *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2003. – №3. – С. 41–48. /Vayserman A.M., Litoshenko A.Ya., Kvitnitskaya-Ryzhova T.Yu. i dr. Molekulyarnyye i kletochnyye aspekty radiatsionnogo gormezisa u *Drosophila melanogaster* // Tsitologiya i genetika. – 2003. – №3. – S. 41–48./
- Виленчик М.М. Молекулярные механизмы старения. – М.: Наука, 1970. – 168с. /Vilenchik M.M. Molekulyarnyye mekhanizmy stareniya. – M.: Nauka, 1970. – 168s./
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459с. /Glants S. Mediko-biologicheskaya statistika. – M.: Praktika, 1998. – 459s./
- Голуб Н.Я., Черник Я.И. Мутації, індуковані рентгенівським опроміненням та деякими хімічними реагентами, що змінюють тривалість життя *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика. – 2008. – №1. – С. 37–44. /Golub N.Ya., Chernyk Ya.I. Mutatsiyi, indukovanі rentgeniv's'kym oprominennyam ta deyakymy khimichnymy reagentamy, shcho zminyuyut' tryvalist' zhyttya *Drosophila melanogaster* // Tsitologiya i genetika. – 2008. – №1. – S. 37–44./
- Ермаков С.П., Гаврилова Н.С. Первичная статистическая обработка данных по выживаемости организмов // Итоги науки и техники. Общие проблемы биологии. – М.: ВИНТИ, 1987. – Т.6. – С. 230–276. /Yermakov S.P., Gavrilova N.S. Pervichnaya statisticheskaya obrabotka dannykh po vyzhivaemosti organizmov // Itogi nauki i tekhniki. Obshchiye problemy biologii. – M.: VINITI, 1987. – T.6. – S. 230 – 276./
- Зайнуллин В.Г. Генетические эффекты хронического облучения малыми дозами ионизирующего излучения. Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук / 03.00.01 – радиобиология. – М., 1997. – 48с. /Zaynullin V.G. Geneticheskiye effekty khronicheskogo oblucheniya malymi dozami ioniziruyushchego izlucheniya. Avtoref. ... d-ra biol. nauk / 03.00.01 – radiobiologiya. – M., 1997. – 48s./
- Крутько В.Н., Славин М.Б., Смирнова Т.М. Математические основания геронтологии. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 384с. /Krut'ko V.N., Slavin M.B., Smirnova T.M. Matematicheskiye osnovaniya gerontologii. – M.: Editorial URSS, 2002. – 384s./
- Москалев А.А., Яцкив А.С., Зайнуллин В.Г. Изменения продолжительности жизни у разных линий *Drosophila melanogaster* после облучения в малых дозах // Генетика. – 2006. – Т.42, №6. – С. 773–782. /Moskalev A.A., Yatskiv A.S., Zaynullin V.G. Izmeneniya prodolzhitel'nosti zhizni u raznykh liniy *Drosophila melanogaster* после oblucheniya v malykh dozakh // Genetika. – 2006. – T.42, №6. – S. 773–782./
- Моссэ И.Б. Радиация и наследственность: генетические аспекты противорадиационной защиты. – Минск: Университетское, 1990. – 208с. /Mosse I.B. Radiatsiya i nasledstvennost': geneticheskiye aspekty protivoradiatsionnoy zashchity. – Minsk: Universitetskoye, 1990. – 208s./
- Никольченко З.Т. Связь проявления гетерозиса и устойчивости с полом при разных типах гетерогаметности. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / 03.00.15 – генетика. – Харьков, 1988. – 18с. /Nikol'chenko Z.T. Svyaz' proyavleniya geterozisa i ustoychivosti s polom pri raznykh tipakh geterogametnosti. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk / 03.00.15 – genetika. – Khar'kov, 1988. – 18s./
- Раушенбах И.Ю., Суханова М.Ж., Хирашима А.И. и др. Роль системы экистероидов в регуляции размножения *Drosophila* в стрессующих условиях среды // Докл. РАН. – 2000. – Т.375, №4. – С. 568–570. /Raushenbakh I.Yu., Sukhanova M.Zh., Khirashima A.I. i dr. Rol' sistemy ekdisteroidov v regulyatsii razmnozheniya *Drosophila* v stressiruyushchikh usloviyakh sredy // Dokl. RAN. – 2000. – T.375, №4. – S. 568–570./
- Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е., Ченцова Н.А. и др. Взаимодействие гормонов в контроле репродуктивной функции самок *Drosophila* в условиях стресса генетически детерминировано // Генетика. – 2001. – Т.37, №9. – С. 1243–1250. /Raushenbakh I.Yu., Gruntenko N.Ye. Chentsova N.A. i dr. Vzaimodeystviye gormonov v kontrole reproductivnoy funktsii samok *Drosophila* v usloviyakh stressa geneticheski determinirovano // Genetika. – 2001. – T.37, №9. – S. 1243–1250./
- Скоробагатько Д.А., Страшнюк В.Ю., Мазилев А.А. Компоненты приспособленности в потомстве *Drosophila melanogaster* после острого γ -облучения // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – 2015а. – Т.16. – С. 78–82. /Skorobagat'ko D.A., Strashnyuk V.Yu., Mazilov A.A. Komponenty prisposoblennosti v potomstve *Drosophila melanogaster* после ostrogo γ -oblucheniya // Faktory eksperimental'noy evolyutsiyi organizmiv. – 2015a. – T.16. – S. 78–82./
- Скоробагатько Д.А., Шакина Л.А., Страшнюк В.Ю., Мазилев А.А. Летальное и рекомбиногенное действие γ -излучения в генетически нестабильной линии *Bar Drosophila melanogaster* // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2015б. – Т.55, №2. – С. 145–154. /Skorobagat'ko D.A., Shakina L.A., Strashnyuk V.Yu., Mazilov A.A. Letal'noye i rekombinogennoye deystviye γ -izlucheniya v geneticheski nestabil'noy linii *Bar Drosophila melanogaster* // Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya. – 2015b. – T.55, №2. – S. 145–154./
- Скулачев В.П. Старение организма – особая биологическая функция, а не результат поломки сложной живой системы: биохимическое обоснование концепции Вейсмана // Биохимия. – 1997. – Т.62. – С. 1369–1399. /Skulachev V.P. Starenie organizma – osobaya biologicheskaya funktsiya, a ne rezul'tat polomki slozhnoy zhivoy sistemy: biokhimicheskoye obosnovaniye kontseptsii Veysmana // Biokhimiya. – 1997. – T.62. – S. 1369–1399./
- Филипоненко Н.С., Волкова Н.Е., Воробьева Л.И. Анализ продолжительности жизни линий *Drosophila melanogaster*, полученных из природных популяций с территорий с различным уровнем радиационного загрязнения // Факторы экспериментальной эволюции организмов: 36. наук. праць. – К.: Логос, 2009. – Т.6.

- C. 402–406. /Filiponenko N.S., Volkova N.Ye., Vorob'yova L.I. Analiz prodolzhitel'nosti zhizni liniy *Drosophila melanogaster*, poluchennykh iz prirodnykh populyatsiy s territoriy s razlichnym urovnem radiatsionnogo zagryazneniya // Faktory eksperimental'noyi evolyutsiyi organizmiv: Zb. nauk. prats'. – K.: Logos, 2009. – T.6. – S. 402–406./
- Arking R. Strategies for stage-specific extension of longevity // Life extension, lessons from *Drosophila* / A.M.Vaiserman et al. (eds.) Healthy ageing and longevity. – Switzerland: Springer International Publishing, 2015. – Vol.3. – P. 321–347.
- Baxter R.C., Blair H.A. Recovery and overrecovery from acute radiation injury as a function of age in *Drosophila* // Radiation Research. – 1969. – no.2 (39). – P. 345–360.
- Clancy D.J. Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background // Aging Cell. – 2008. – no.7. – P. 795–804.
- Fox C.W., Czesak M.E., Wallin W.G. Complex genetic architecture of population differences in adult lifespan of a beetle: nonadditive inheritance, gender differences, body size and a large maternal effect // J. Evol. Biol. – 2004. – no.17. – P. 1007–1017.
- Giess M.C. Differences between natural ageing and radio-induced shortening of the life expectancy in *D. m.* // Gerontology. – 1980. – №26. – P. 301–310.
- Greer E.L., Maures T.J., Ucar D. et al. Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans* // Nature. – 2011. – Vol.479. – P. 365–373.
- Haldane J.B.S. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals // J. Genet. – 1922. – Vol.12, no.2. – P. 101–110.
- Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009 // Biogerontology. – 2009. – Vol.10. – P. 773–781.
- Huxley J.S. Sex determination and related problems // Med. Sci. Abstr. And Rev. – 1924. – Vol.10, no.2. – P. 91–124.
- Izmaylov D.M., Obukhova L.K. Life span variations in 128 successive generations of *Drosophila melanogaster* I. Evidence that the phenomenon exists and analysis of the variations mode // Mechanisms of Ageing and Development. – 2003. – Vol.124. – P. 589–597.
- Izmaylov D.M., Obukhova L.K., Konradov A.A. Correlations of life-span variation parameters in 128 successive generations of *Drosophila melanogaster* with changes in atmospheric pressure and geomagnetic activity // Int. J. Biometeorol. – 2005. – Vol.49. – P. 337–344.
- Izmaylov D.M., Obukhova L.K., Okladnova O.V., Akifyev A.P. Phenomenon of life span instability in *Drosophila melanogaster*. II. Change in rhythm of natural variations of life span after single exposure to γ -irradiation // Experimental Gerontology. – 1993. – Vol.28. – P. 181–194.
- Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T., Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases // Lancet. – 1989. – Vol.1. – P. 642–645.
- MacArthur J.W., Baillie W.H.T. Sex differences in mortality and metabolic activity in *Daphnia magna* // Science. – 1926. – Vol.64, no.1644. – P. 229–230.
- Maistrenko O.M., Serga S.V., Vaiserman A.M., Kozeretska I.A. Effect of *Wolbachia* infection on aging and longevity-associated genes in *Drosophila* // Life extension, lessons from *Drosophila* / A.M.Vaiserman et al. (eds.) Healthy ageing and longevity. – Switzerland: Springer International Publishing, 2015. – Vol.3. – P. 83–104.
- Medawar P.B. Old age and natural death // Modern Quarterly. – 1946. – Vol.2. – P. 30–49.
- Moskalev A., Aliper A., Smit-McBride Z. et al. Genetics and epigenetics of aging and longevity // Cell Cycle. – 2014. – Vol.13, no.7. – P. 1063–1077.
- Moskalev A.A., Plyusnina E.N., Shaposhnikov M.V. Radiation hormesis and radioadaptive response in *Drosophila melanogaster* flies with different genetic backgrounds: the role of cellular stress-resistance mechanisms // Biogerontology. – 2011. – Vol.12. – P. 253–263.
- Paaby A.B., Schmidt P.S. Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster* // Fly. – 2009. – Vol.3, no.1. – P. 29–38.
- Promislow D.E.L., Tatar M., Pletcher S., Carey J.R. Below threshold mortality: implications for studies in evolution, ecology and demography // J. Evol. Biol. – 1999. – Vol.12. – P. 314–328.
- Riddle O. Factors in the development of sex and secondary sexual characteristics // Physiol. Rev. – 1931. – Vol.38, no.11. – P. 63–106.
- Sarup P., Loeschcke V. Life extension and the position of the hormetic zone depends on sex and genetic background in *Drosophila melanogaster* // Biogerontology. – 2011. – Vol.12. – P. 109–117.
- Seong K.M., Kim C.S., Seo S.W. et al. Genome-wide analysis of low-dose irradiated male *Drosophila melanogaster* with extended longevity // Biogerontology. – 2011. – Vol.12. – P. 93–107.

Vaiserman A.M. Hormesis and epigenetics: Is there a link? // Ageing Research Reviews. – 2011. – Vol.10. – P. 413–421.

Vaiserman A.M. Transgenerational inheritance of longevity: an epigenetic phenomenon? // J. Gerontol. Geriat. Res. – 2012. – Vol.1, no.4. – doi:10.4172/2167-7182.1000e116.

Vaiserman A.M., Koshel N.M., Mechova L.V., Voitenko V.P. Cross-life stage and crossgenerational effects of gamma irradiations at the egg stage on *Drosophila melanogaster* life histories // Biogerontology. – 2004. – Vol.5. – P. 327–337.

Waskar M., Landis G.N., Shen J. et al. *Drosophila melanogaster* p53 has developmental stage-specific and sex-specific effects on adult life span indicative of sexual antagonistic pleiotropy // Aging. – 2009. – Vol.1, no.11. – P. 903–936.

Wayne M.L., Telonis-Scott M., Bono L.M. et al. Simpler mode of inheritance of transcriptional variation in male *Drosophila melanogaster* // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Vol.104, no.47. – P. 18577–18582.

Williams G.C. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence // Evolution. – 1957. – Vol.11. – P. 398–411.

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: В.В.Навроцька / Reviewer: V.V.Navrotskaya

Подано до редакції / Received: 20.03.2016

УДК: 575.162:57.024:591.185.1

Характеристика фенотипових змін та генетичний аналіз нейродегенеративної мутації 3.5.8 *Drosophila melanogaster*

О.В.Щербакова, Л.С.Боднар, С.М.Горбулінська, Я.І.Черник

Львівський національний університет імені Івана Франка (Львів, Україна)
oksana_kysla@yahoo.com

Досліджено рухову активність нейродегенеративних мутантів 3.5.8 методом відкритого поля. Виявлено значне зниження довжини пробігу мутантів різного віку, збільшення часу вмивання та періоду спокою при старінні. Показано, що дегенерація у мозку особин лінії 3.5.8 з'являється з 10 дня життя імаго у вигляді вакуолей у всіх ділянках мозку. Згідно отриманих результатів, зміни рухової поведінки мутантів проявляються ще до появи дегенеративних змін у мозку і прогресують з віком. Мутацію 3.5.8 картовано в ділянці 63F1–64A4 третьої хромосоми. Проаналізовано гени, що містяться у даному районі та відібрано кандидати для проведення подальшого комплементацийного аналізу.

Ключові слова: нейродегенерація, поведінка, дрозофіла.

Характеристика фенотипических изменений и генетический анализ нейродегенеративной мутации 3.5.8 *Drosophila melanogaster*

О.В.Щербакова, Л.С.Боднар, С.М.Горбулинская, Я.И.Черник

Исследована двигательная активность нейродегенеративных мутантов 3.5.8 методом открытого поля. Выявлено значительное снижение длины пробега мутантов разного возраста, увеличение времени умывания и периода покоя при старении. Показано, что дегенерация в мозге особей линии 3.5.8 появляется с 10 дня жизни имаго в виде вакуолей во всех участках мозга. Согласно полученным результатам, изменения двигательного поведения мутантов проявляются еще до появления дегенеративных изменений в мозге и прогрессируют с возрастом. Мутация 3.5.8 картирована в области 63F1–64A4 третьей хромосомы. Проанализированы гены, содержащиеся в данном районе, и отобраны кандидаты для проведения дальнейшего комплементационного анализа.

Ключевые слова: нейродегенерація, поведінка, дрозофіла.

Characteristics of phenotypic changes and genetic analysis of *Drosophila melanogaster* neurodegenerative mutation 3.5.8

O.V.Shcherbakova, L.S.Bodnar, S.M.Gorbulinska, Ya.I.Chernyk

The locomotor activity of neurodegenerative mutants 3.5.8 has been studied. We have shown a significant reduction of run-length in mutants of different age, increase of grooming time and rest period with age. The study of mutants' brain tissue revealed that neurodegenerative changes in these flies appeared in all parts of the brain on the 10th day after eclosion. According to the results, changes in mutants' locomotor behavior appeared before the degenerative changes emergence in the brain and progressed with age. Mutation 3.5.8 was mapped in the region 63F1–64A4 of the third chromosome. Genes, localized in this region were analyzed and the candidates for further tests were selected.

Key words: neurodegeneration, behavior, drosophila.

Вступ

Поряд із зростанням середньої тривалості життя людства і збільшенням кількості людей, старших за 60 років, підвищується частота появи нейродегенеративних захворювань у суспільстві. Дослідженнями механізмів нейродегенерацій займаються вже не одне десятиліття, проте ефективних способів терапії не винайдено досі (Mochizuki, Mizuno, 2003; O'Connor, Boulis, 2015; Roselli, Caron, 2015). Доцільність використання *D. melanogaster* як модельного об'єкту у вивченні патологічних процесів центральної нервової системи доведена багатьма дослідженнями (Chan, Bonini, 2000; Prussing et al., 2013). Мутанти дрозофіли, індуковані чи сконструйовані в лабораторії, стали важливим джерелом знань про структуру і функціонування нервової системи: поведінку, біологічні ритми,

пам'ять та механізми нейродегенеративних процесів. Метою даного дослідження було вивчення фенотипових змін в особин лінії 3.5.8 та встановлення локалізації мутації, що їх зумовлює.

Об'єкти та методи дослідження

В роботі використовували лінію 3.5.8, що містила мутацію в гені третьої хромосоми, та лінію дикого типу Oregon-R. Досліджувані лінії мух утримували в пробірках на стандартному цукрово-дріжджовому поживному середовищі (Ashburner, 1989) в термостаті при 23°C.

Для вивчення характеру нейродегенеративних змін виготовляли парафінові зрізи (Heisenberg, Bohl, 1979). Наявність та розміщення дегенерації у мозку аналізували за допомогою мікроскопу Laboval-3 Carl Zeiss Jena при збільшенні 15x40.

Рухова активність мух вивчалася за допомогою метода відкритого поля. Для цього мух досліджуваних ліній індивідуально поміщали в чашку Петрі, розграфлену на квадрати по 0,5 см, і за допомогою відеокамери фіксували поведінку кожної особини протягом 10 хв. Для кожного досліду використовували не менше 25 самців однієї лінії певного віку. Досліджувані особини не піддавались ефіризації щонайменше 1 добу. Дослід проводили в один і той самий час за однакових температурних умов та освітлення лампою денного світла. Отриманий відеоматеріал аналізували з визначенням таких показників: довжина пробігу, кількість стрибків, час, затрачений на вмивання, та час спокою. Довжина пробігу особин кожного генотипу вимірювалась в см, при цьому перетин одного квадрата рахувався пробігом довжиною 0,5 см.

Для локалізації мутації 3.5.8 проводили схрещування особин цієї лінії з маркерними лініями *R D Sb/TM6* і *Ly/TM6B*, а також з лініями, що несли делеції у відповідних ділянках третьої хромосоми: 6462 (район 64F–65C4), 6755 (район 62E8–63B6), 8059 (район 63C1–63F5), 8061 (район 64B9–64C13), 8973 (район 62D7–62E5), 24389 (район 62B7–62D3), 24392 (район 63F1–64A4), 24395 (район 64C1–64E1), 24409 (район 62D4–62E1), 25118 (район 64A10–64B7). Маркерні та делеційні лінії були отримані з Bloomington *Drosophila* Stock Center.

P1 ♀ *m/m* × ♂ *R D Sb/TM6*

P2 ♀ *R D Sb/m* × ♂ *Ly/TM6B*

P3 ♀ *R m/TM6B*
m D Sb/TM6B
R/TM6B
R D/TM6B × ♂ *m/m*
m Sb/TM6B
D Sb/TM6B

F3 ♀ ♂ *R m/m*
m D Sb/m
R/m
R D/m
m Sb/m
D Sb/m

Рис. 1. Схеми схрещувань для картування нейродегенеративної мутації 3.5.8. *R* – *Roughened*, неоднорідна поверхня очей; *D* – *Dichaete*, розчепірені крила; *Sb* – *Stubble*, зменшені щетинки; *Ly* – *Lyra*, крила з обрізаним внутрішнім краєм; *TM6* і *TM6B* – балансери за 3-ю хромосомою; *m* – рецесивна нейродегенеративна мутація 3.5.8

Для уникнення повторної рекомбінації усіх потомків F2 переводили на балансер *TM6B* і відбирали серед них тих, що не мали маркера *Ly*. Аналізували мух F3 індивідуально, вивчали старіння і виготовляли гістологічні препарати мозку. За умови розміщення мутації між генами *R* та *D* не буде виявлено нейродегенеративних мутантів з генотипом *R D/m* або ж вони будуть зустрічатися з дуже низькою частотою.

Статистична обробка даних була проведена за допомогою програмного забезпечення «Microsoft Excel». Достовірність отриманих результатів перевіряли за допомогою критеріїв Пірсона або Стьюдента. Позначали (**) – достовірну різницю при рівні значущості $p \leq 0,01$; (*) – $p \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Особини лінії 3.5.8 характеризувалися зниженою тривалістю життя (Щербакова, 2009). Нейродегенеративний фенотип у мутантів виявлявся на 10-й день життя дорослої особини і з віком прогресував. Вакуолізація з'являлася у всіх ділянках мозку, як у кортексі, де розміщені тіла нейронів, так і в нейропілі, де знаходяться відростки нейронів та тіла глії (рис. 2).

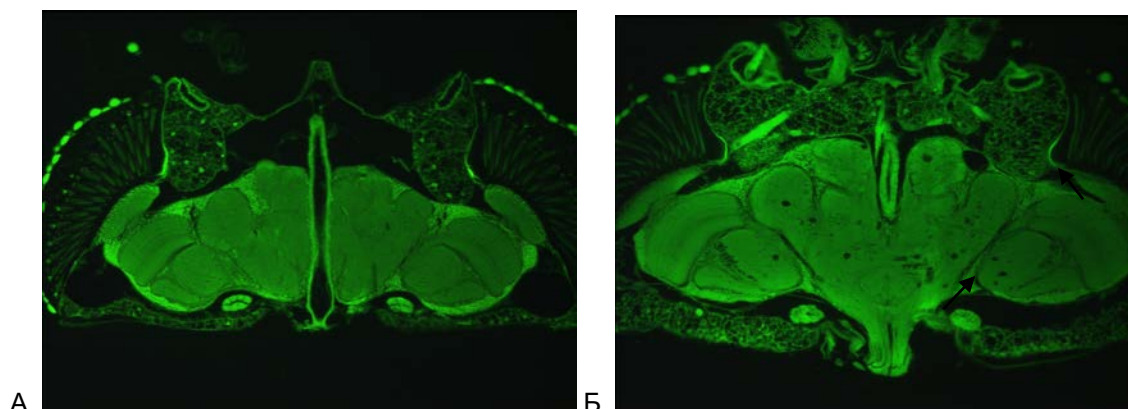


Рис. 2. Зрізи тканини мозку особин лінії Oregon-R (А) та 3.5.8 (Б) 21-денного віку

При аналізі зрізів цих ділянок мозку мутантів 3.5.8 в електронному мікроскопі виявили гіперзакручування мембран глії навколо тіл нейронів і порушення їхньої форми (Щербакова та ін., 2009). В процесі метаморфозу дрософіли глія огортає тіло нейрональної клітини та її відростки (Kretzschmar, Pflugfelder, 2002). Відомі мутації дрософіли, що зумовлюють розвиток нейродегенерації внаслідок порушення розвитку глії та її неправильного обгортання нейронів (Buchanan, Benzer, 1993). У мутантів дрософіли *drop-dead* виявлено віково-залежну нейродегенерацію та відмирання нейронів, які пов'язані з затримкою розвитку глії і неповним обгортанням нейронів, спричинені порушенням взаємодій між нейронами і глією. Іншим прикладом ролі глії стали дослідження мутантів *gero*. У 2-тижневих мутантів *gero* відмирають майже всі клітинні тіла ламіни (Xiong et al., 1994). Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що ще на стадії лялечки мутантів *gero* половині нейронів ламіни властиві перші ознаки апоптозу. Дисфункція глії веде спочатку до загибелі нейронів, і лише потім відмирають самі гліальні клітини. Відомо (Buchanan, Benzer, 1993), що в хребетних нормальна кількість гліальних клітин регулюється взаємодією нейронів і глії; проліферація гліальних попередників і виживання новоутворених клітин глії залежить від кількості і довжини аксонів рухових нейронів. Можливо, мутація 3.5.8 веде до пошкодження гену, продукт якого задіяний у механізмах взаємодії між нейронами і клітинами глії.

Нейродегенеративні захворювання людини супроводжуються різноманітними порушеннями поведінки. В пацієнтів з хворобою Паркінсона спостерігають порушення координації рухів, в пацієнтів з хореею Гантінгтона – появу мимовільних рухів (Prussing et al., 2003). Попередньо, в мутантів 3.5.8 нами була показана змінена статеві та загальна рухова активність (Матийцив и др., 2009), а також фототаксична поведінка (Щербакова, 2009). Під час досліджень рухової поведінки в особин лінії 3.5.8 довжина пробігу була зменшеною вже в 3–5-денних мух, порівняно з контролем і продовжувала знижуватися з віком (рис. 3 А).

При порівнянні величини пробігу і часу, затраченого на нього, було показано, що швидкість руху контрольних особин зменшувалася при старінні (0,48 см/с і 0,36 см/с відповідно). У 3–5-денних нейродегенеративних мутантів швидкість руху була в 1,7 разів нижчою порівняно з контролем і становила 0,27 см/с, з віком цей показник незначно змінювався і становив 0,23 см/с.

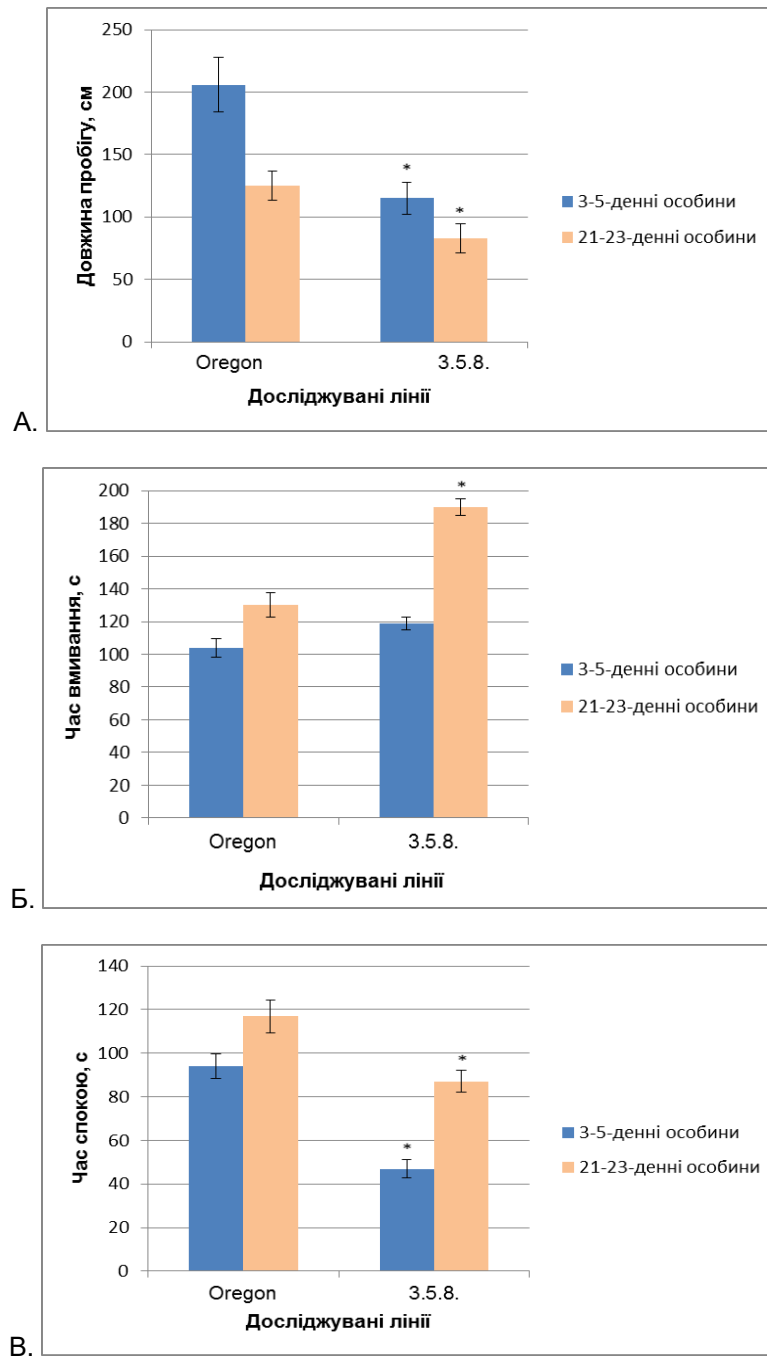


Рис. 3. Рухова активність особин досліджуваних ліній різного віку

В 3–5-денних особин лінії 3.5.8 зафіксований збільшений час, що затрачувався на вмивання, та зменшений час відносного спокою, порівняно з контролем (рис. 3 Б, В). Вмивання мух має не лише гігієнічне значення, цей аспект поведінки порівнюють з повторювальною поведінкою людей з неврологічними захворюваннями (Prussing et al., 2003). Наприклад, мухи з мутацією в гені *FMR1* (гомолог людського гену, який пов'язують з розвитком аутизму) мають порушену статеву поведінку і замість того, щоб залицятися до самок, затрачають великий проміжок часу на власне вмивання. Повторювальні рухи спостерігаються і у людей з аутизмом, в яких виявлено мутацію у цьому гені.

Ще одним показником, за яким проводили аналіз, була кількість стрибків. Їх розглядають як спроби мух злетіти. В молодих особин лінії 3.5.8 цей показник був достовірно вищим порівняно з контрольними мухами, а з віком різко зменшувався (рис. 4).

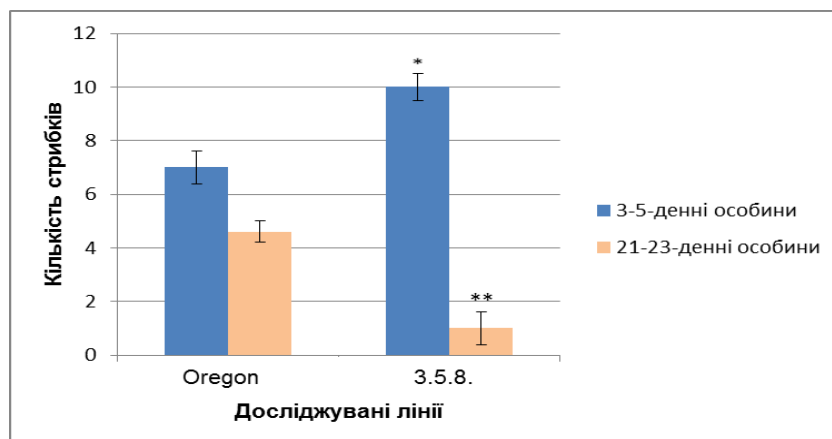


Рис. 4. Кількість стрибків, що здійснювали особини досліджуваних ліній різного віку

Згідно отриманих результатів, особини лінії 3.5.8 характеризуються значними змінами рухової поведінки, що проявляються ще до появи дегенеративних змін у мозку і прогресують з віком.

Під час картування мутації 3.5.8 було проаналізовано більше 500 особин F3. Найвища частота появи нейродегенеративного фенотипу виявлена у особин з генотипами *R m/m* і *m Sb/m*. Серед нащадків з генотипом *m D Sb/m* також зустрічалися особини з нейродегенеративним фенотипом, проте такого фенотипу не виявили серед особин з генотипом *R D/m*. Таким чином, мутація 3.5.8 була локалізована між генами *R (Roughened)*, що розташований в ділянці 62B7, і *D (Dichaete)*, який міститься в ділянці 70D3. Наступний етап картування полягав у схрещуванні мутанта 3.5.8 із серією делеційних ліній, кожна з яких містила делецію на проміжку 62B7–70D3. В результаті нейродегенеративний фенотип 3.5.8 отримано при схрещуванні з делеційним мутантом 24392, що означає, що мутація знаходиться у ділянці 63F1–64A4 третьої хромосоми. В цій ділянці виявлено близько 40 білкових генів, з них – 8 (табл. 1) відомі своєю участю у процесах, що задіяні у формуванні чи функціонуванні нервової системи (www.flybase.org). Проте для жодного з них не описано мутації з нейродегенеративним фенотипом.

Таблиця 1.

Гени-кандидати для локалізації мутації 3.5.8

Ген	Розміщення у хромосомі	Продукт	Процеси, в яких задіяний продукт
<i>Scsalpha</i>	63F1	α-субодиниця сукцинат-КоА лігази	розвиток центральної та периферійної нервової системи
<i>Awh</i>	63F4	транскрипційний фактор	правильна будова фоторецепторних клітин ока
<i>Ida</i>	63F6	невідомий	нейрогенез, розвиток імагінальних дисків
<i>Eip63F-1</i>	63F6-64A1	Ca ²⁺ -зв'язуючий білок	автофагія, захист від оксидативного стресу
<i>Gr63a</i>	63F5	7TM хеморецептор	сприйняття смаку, захист від оксидативного стресу
<i>Ccz1</i>	63F5	невідомий	автофагія, сприйняття больових сигналів; в мутантів знижена тривалість життя
<i>scrt</i>	64A2-64A3	транскрипційний фактор	розвиток нервової системи, фоторецепторних клітин; мутанти виявляють поведінкові порушення
<i>fd64A</i>	64A4	транскрипційний фактор	диференціація нейронів, ріст аксонів

Для підтвердження локалізації мутації необхідно провести комплементацийний аналіз з мутантами за генами-кандидатами, проте вже зараз можна стверджувати, що дана мутація є новою, не описаною раніше, а дані мутанти є зручною моделлю у дослідженні механізмів нейродегенеративних процесів та порушень поведінки.

Список літератури

- Матійців Н.П., Магоривська І.Б., Щербакова О.В. и др. Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по 3-й хромосоме, индуцированных этилметансульфонатом // Генетика. – 2009. – Т.45, №2. – С. 196–202. /Matiytsiv N.P., Magorivska I.B., Shcherbakova O.V., Chernik Ya.I., Maksymiv D.V. Geneticheskiy analiz neyrodegenerativnykh mutantov *Drosophila melanogaster* po 3-y khromosome, indutsirovannykh etilmetansul'fonatom // Genetika. – 2009. – Т.45, №2. – С. 196–202./
- Щербакова О.В. Генетичний аналіз та поведінкові реакції мутантів *Drosophila melanogaster* із дегенеративними змінами в тканині мозку. Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.15 – генетика. – Львів, 2009. – 20с. /Shcherbakova O.V. Genetychnyy analiz ta povedinkovi reaktsiyi mutantiv *Drosophila melanogaster* iz degeneratyvnyumu zminamy v tkanyni mozku. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk / 03.00.15 – genetyka. – L'viv, 2009. – 20s./
- Щербакова О.В., Матійців Н.П., Максимів Д.В. Виявлення механізмів клітинної смерті у нейродегенеративних мутантів *Drosophila melanogaster* // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2009. – Т.7. – С. 435–438. /Shcherbakova O.V., Matiytsiv N.P., Maksymiv D.V. Vyyavlennya mekhanizmv klitinnoyi smerti u neyrodegeneratyvnykh mutantiv *Drosophila melanogaster* // Faktory eksperymental'noi evolyutsiyi organizmv: Zb. nauk. pr. – K.: Logos, 2009. – Т.7. – С. 435–438./
- Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual.* – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – P. 179–189.
- Buchanan R.L., Benzer S. Defective glia in the *Drosophila* brain degeneration mutant drop-dead // Neuron. – 1993. – Vol.10. – P. 839–850.
- Chan H., Bonini N.M. *Drosophila* models of human neurodegenerative disease // Cell Death and Differentiation. – 2000. – Vol.7. – P. 1075–1080.
- O'Connor D.M., Boulis N.M. Gene therapy for neurodegenerative diseases // Trends in Mol. Med. – 2015. – Vol.21, is.8. – P. 504–512.
- Heisenberg M., Bohl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means // Naturforschung. – 1979. – Vol.34. – P. 143–147.
- Kretzschmar D., Pflugfelder G.O. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain // Brain Research Bulletin. – 2002. – Vol.57. – P. 121–131.
- Mochizuki H., Mizuno Y. Gene therapy for Parkinson's disease // Adv. in Research on Neurodegen. – 2003. – Vol.10. – P. 205–215.
- Prussing K., Voigt A., Schulz J. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease // Mol. Neurodegeneration. – 2013. – Vol.8. – P. 35–46.
- Roselli F., Caron P. From intrinsic firing properties to selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases // Neuron. – 2015. – Vol.85, is.5. – P. 901–910.
- Xiong W.C., Okano H., Patel N.H. *Repo* encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system // Genes and Development. – 1994. – Vol.8. – P. 981–994.

Представлено: О.М.Вайсерман / Presented by: A.M.Vaiserman

Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 20.03.2016

••• ГЕНЕТИКА ••• GENETICS •••

УДК: 575.17: 599.9

Индексы потенциального отбора в популяции крымских татар Л.А.Атраментова, Л.А.Мустафаева

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
atramentova@yandex.ru; liliya.must@gmail.com

Параметры естественного отбора у крымских татар типичны для современных популяций, характеризующихся гораздо более высоким индексом дифференциальной плодовитости по сравнению с индексом дифференциальной смертности при относительно небольшом значении индекса тотального отбора. За одно поколение тотальный показатель отбора I_{tot} в популяции крымских татар уменьшился с 0,37 до 0,25. Удельный вес компоненты I_m , обусловленной дифференциальной смертностью, в структуре общего показателя отбора уменьшился с 27 до 20%, удельный вес компоненты, обусловленной дифференциальной плодовитостью, повысился с 73 до 80%. Значимые различия в показателях отбора между субэтническими группами крымских татар не выявлены.

Ключевые слова: естественный отбор, индекс Кроу, крымские татары.

Індекси потенційного добору в популяції кримських татар Л.О.Атраментова, Л.А.Мустафаева

Параметри природного добору у кримських татар є типовими для сучасних популяцій, які характеризуються значно більш високим індексом диференціальної плодючості порівняно із індексом диференціальної смертності при відносно невеликому значенні індексу тотального добору. За одне покоління тотальний показник добору I_{tot} в популяції кримських татар зменшився з 0,37 до 0,25. Питома вага компоненти I_m , що обумовлена диференціальною смертністю, в структурі загального показника добору зменшилася з 27 до 20%, питома вага компоненти, що обумовлена диференціальною плодючістю, зросла з 73 до 80%. Значущі розбіжності у показниках добору між субетнічними групами кримських татар не знайдені.

Ключові слова: природний добір, індекс Кроу, кримські татари.

Crow's index in the population of Crimean Tatars L.A.Atramentova, L.A.Mustafaeva

The parameters of natural selection in Crimean Tatars are typical for modern populations. They are characterized by a much higher index of differential fertility in comparison with the index of differential mortality at a relatively small value of the index of total selection. For one generation the total selection index I_{tot} in the Crimean Tatars population has decreased from 0,37 to 0,25. Specific weight of I_m component, which is due to differential mortality, in the general structure of the total selection index has decreased from 27 to 20%, the proportion of the component, which is due to differential fertility, has increased from 73 to 80%. Significant differences in the selection index between sub-ethnic groups of Crimean Tatars have not been identified.

Key words: natural selection, Crow's index, Crimean Tatars.

Введение

В ходе исторического развития естественное репродуктивное поведение человека сменяется регулируемым. Расширенное воспроизводство населения переходит через простое к суженному, плодовитость супружеских пар снижается, выживаемость потомства повышается (Динамика ..., 2004; Курбатова и др., 2012; Кучер, Курбатова, 1986; Тимаков, Курбатова, 1991; Kurbatova et al., 2005). Изменение в репродуктивном поведении отражается на интенсивности отбора, измеряемого индексами Кроу (I_{tot} , I_m , I_f). Снижение общего показателя отбора I_{tot} , изменение пропорции индексов дифференциальной смертности I_m и дифференциальной плодовитости I_f – закономерность, отмеченная в разных популяциях и этнических группах (Байысбекова, 2012; Березина и др., 2005;

Булаева и др., 1995; Ельчинова и др., 2012; Кривенцова, 2006; Посух и др., 1996; Das, Mithun, 2010; Henrich et al., 2012), однако крымские татары в этом списке отсутствуют. Целенаправленные популяционно-генетические исследования крымских татар ранее не проводились, но фрагментарная информация была получена при генетико-демографическом описании населения Крыма на примере г. Евпатория (Атраментова и др., 2013).

Крымские татары – народ, историческим ядром которого были тюркские племена, сформировался в Крыму в XIII–XVII веках. Антропологическими исследованиями, выполненными в 1926 г. Г.А.Бонч-Осмоловским, выделены три субэтнуса крымских татар с точной географической привязкой: степные (20%), южнобережные (30%) и горные (50%) (Тюркские ... , 2003). Большинство южнобережных крымских татар до депортации жили на полосе вдоль берега моря от Балаклавы до Феодосии. Южнобережцы принадлежат к южно-европейской (средиземноморской) расе. В этногенезе данного субэтнуса основную роль сыграли греки, готы, малоазийские турки и черкесы. В этой группе встречаются индивиды с ярко выраженными чертами северо-европейской расы. Степняки проживали в степи к северу от условной линии Николаевка–Гвардейское–Феодосия. Основное участие в этногенезе степняков приняли западные кыпчаки (половцы), восточные кыпчаки и ногайцы. В расовом отношении степняки являются европеоидами с элементами монголоидности. Представители горного субэтнуса жили в горах и предгорьях, южнее степняков и к северу от южнобережцев. В формировании горного субэтнуса приняли участие практически все народы и племена, когда-либо жившие в Крыму. Особо важной в этом процессе считается роль готов, греков и кыпчаков. Горные крымские татары относятся к средневропейской расе, внешне похожи на представителей народов центральной и восточной Европы, часть из них похожа на северокавказские народы, а часть на русских и украинцев. До 1940-х годов субэтнуса крымских татар практически не смешивались. Депортация 1944 года разрушила традиционные ареалы расселения, и естественные границы между субэтносами исчезли. Массовое возвращение крымских татар на историческую родину началось в 1989 году. Невозможность для представителей субэтносов селиться в местах своего традиционного проживания в Крыму усилила процесс их слияния в единую общность (Возгрин, 1992; Крымскотатарская ..., 1993; Очерки ..., 2005). Высокая смертность при депортации, вынужденное расселение в Крыму после репатриации вне территории традиционного проживания – всё это могло отразиться на приспособленности, индикатором которой служат показатели отбора (индексы Кроу).

Цель данного исследования – оценить интенсивность отбора в популяции крымских татар с учётом субэтнической принадлежности.

Материал и методы

Данные акушерско-гинекологического анамнеза крымскотатарских женщин были собраны в 2013 г. в специализированном лечебном учреждении – Крымском республиканском учреждении «Медицинский центр по обслуживанию депортированных народов» (г. Симферополь). Анкетирована 261 женщина пострепродуктивного возраста (46–90 лет). Анкета включала вопросы о национальности женщины и её родителей с учётом субэтнуса. Этническую принадлежность, записанную по самоидентификации, сверяли с родословной. Учитывалось количество беременностей и их исходов: медицинские и спонтанные аборт, внематочные беременности, количество мёртворождений и живорождений. Женщины, которым на момент исследования было 46–67 лет ($n=44$), отнесены к условному первому поколению, женщины в возрасте 68–90 лет ($n=217$) – ко второму. Разница границ возрастных интервалов составляет 22–23 года, что примерно соответствует человеческому поколению. Распределения показателей репродукции отклонялись от нормального, поэтому при сравнении количественных переменных использована непараметрическая статистика с критериями U Манна-Уитни. Сравнение долей проведено путём ϕ -преобразования с помощью критерия F .

Индекс тотального отбора (I_{tot}), представляющий собой верхнюю возможную оценку интенсивности селективного давления, рассчитан по J.Crow (1958) (цит. по «Динамика ...», 2004).

$$I_{tot} = I_m + \frac{I_f}{P_s}$$

$$I_m = \frac{P_d}{P_s}$$

где p_d – доля индивидуумов, умерших до репродуктивного возраста, p_s – доля индивидуумов, доживших до репродуктивного возраста. Данные о смертности рассчитаны по данным справочного материала (Статистичний ..., 2004).

Компонента отбора (I_f), связанная с дифференциальной плодовитостью, вычислена как:

$$I_f = \frac{\sigma_k^2}{\bar{k}^2}$$

где \bar{k} – среднее число потомков, приходящееся на одну женщину, завершившую репродуктивный период; σ_k^2 – дисперсия числа потомков.

Результаты и обсуждение

Число беременностей, отражающее потенциальную плодовитость в изученной когорте крымскотатарских женщин, достигает двенадцати. Максимальная реализованная плодовитость составляет шесть живорождённых детей. Естественные внутриутробные потери у отдельных женщин доходят до четырёх (выкидыши), искусственные потери (медицинские аборт) – до девяти (табл. 1).

Таблица 1.

Распределение числа беременностей и их исходов у крымскотатарских женщин

x	F					
	беременности	медицинские аборт	спонтанные аборт	внематочные беременности	мёртворождения	живорождения
0	14	147	189	258	242	14
1	12	39	49	3	15	21
2	47	44	17		4	107
3	49	20	3			71
4	46	3	1			32
5	39	3				13
6	23	0				3
7	16	1				
8	9	0				
9	2	1				
10	1					
11	2					
12	1					
$\sum f=n$	261	258	259	261	261	261
$\sum xf$	1016	230	96	3	23	659
\bar{x}	3,89	0,89	0,37	0,01	0,09	2,52
Mo	3	0	0	0	0	2
Me	4	0	0	0	0	2

Примечание: x – число репродуктивных событий, f – количество женщин, имевших репродуктивные события, \sum – знак суммирования, \bar{x} – среднее арифметическое, Me – медианное значение, Mo – модальное значение.

Динамика репродуктивных показателей у крымских татар соответствует глобальной тенденции. За одно поколение число женщин, не имевших беременности, увеличилась с 4,5 до 5,5%. Повысился удельный вес женщин, искусственно прервавших беременности (с 34 до 45%). Возросло число женщин, в анамнезе которых отмечены спонтанные аборт (с 32 до 34%) и мёртворождения (с 4,5 до 7,8%) (табл. 2).

В среднем на одну женщину стало меньше беременностей (3,8 против 4,2, табл. 3), родов (2,6 и 2,9 соответственно). Среднее число живых детей, хотя и снизилось (с 2,8 до 2,5), но остаётся достаточным для расширенного воспроизводства населения.

Перечисленные показатели репродукции отразились на значениях индексов Кроу. Их динамика в популяции крымских татар находится в русле глобальных закономерностей: наряду со снижением всех индексов отбора удельный вес компоненты, связанной с дифференциальной плодовитостью (I_f), увеличивается, а значение компоненты, обусловленной дифференциальной смертностью (I_m), снижается. За поколение в изученной популяции тотальный показатель отбора уменьшился с 0,37 до 0,25. Удельный вес компоненты I_m снизился с 27 до 20%, соответственно увеличилась компонента, обусловленная дифференциальной плодовитостью (табл. 4).

Таблица 2.
Групповые характеристики репродукции крымскотатарских женщин в двух поколениях

Показатели	Поколение 1	Поколение 2
Количество женщин (n):	44	218
не имели беременностей, %	4,5	5,5
имели медицинские аборт, %	34,1	45,4
имели спонтанные аборт, %	31,8	33,5
имели внематочные беременности, %	2,3	0,9
имели мёртворождения, %	4,5	7,8
Искусственно прерванные беременности, %	18,4	24,3
Реализованные зиготы, %	68,6	66,8

Таблица 3.
Среднее число беременностей и их исходов у крымскотатарских женщин в двух смежных поколениях

Показатели	Поколение 1		Поколение 2	
	\bar{x} (s)	95% ДИ \bar{x}	\bar{x} (s)	95% ДИ \bar{x}
Беременности	4,2 (2,6)	3,4–5,0	3,8 (2,1)	3,2–4,4
Медицинские аборт	0,8 (1,3)	0,6–1,0	0,9 (1,4)	0,8–1,0
Спонтанные аборт	0,5 (0,9)	0,34–0,66	0,3 (0,6)	0,26–0,34
Внематочные беременности	0,02 (0,10)	0,014–0,026	0,01 (0,1)	0,008–0,012
Роды	2,9 (1,3)	2,5–3,3	2,6 (1,0)	2,5–2,7
Мёртворождения	0,07 (0,3)	0,05–0,09	0,09 (0,3)	0,07–0,10
Живорождения	2,8 (1,4)	2,0–3,6	2,5 (1,1)	2,1–2,9

Примечания: \bar{x} – среднее арифметическое, s – стандартное отклонение, 95% ДИ \bar{x} – 95%-й доверительный интервал среднего арифметического.

Из-за небольшого размера старшей группы различия между поколениями не достигли уровня статистической значимости, однако ввиду того, что изменения аналогичны мировым тенденциям, полученные оценки можно считать надёжными. Отмеченная в популяции крымских татар динамика индексов отбора в меньшей степени выражена по сравнению с изменением этих показателей у русских и украинок, проживающих в Крыму (Атраментова и др., 2013).

Отмечены небольшие различия в репродуктивных показателях репродукции женщин из разных субэтнотосов: не имели беременности 2% южнобережных крымских татарок, 6% степных и почти 9% горных. Искусственно регулировали рождаемость 54% южнобережных женщин, 40% горных и 38% степных. Процент женщин, указавших на мертворождения, варьирует между субэтнотосами в пределах 3–8%. Рассчитанные по данным о витальных характеристиках показатели отбора представлены в табл. 5.

Как видим, существенных различий по величине индексов Кроу между субэтнотосами крымских татар в данном исследовании не выявлено, что может быть обусловлено отсутствием между ними в настоящее время географической и репродуктивной изоляции.

Таблица 4.

Индексы отбора в двух поколениях крымских татар

Показатели	Поколение 1 (n=44)	Поколение 2 (n=218)
\bar{k}	2,80	2,50
\bar{k}^2	7,84	6,25
σ^2_k	1,96	1,21
$I_f = \sigma^2_k / \bar{k}^2$	0,25	0,19
p_s	0,91	0,95
p_d	0,09	0,05
$I_m = p_d / p_s$	0,10	0,05
I_f / p_s	0,27	0,20
$I_{tot} = I_m + I_f / p_s$	0,37	0,25

Примечание: \bar{k} – среднее число потомков; σ^2_k – дисперсия числа потомков; I_f – дифференциальная плодовитость; p_s – доля индивидуумов, доживших до репродуктивного возраста; p_d – доля индивидуумов, умерших до репродуктивного возраста; I_m – дифференциальная смертность; I_{tot} – индекс тотального отбора.

Таблица 5.

Индексы отбора в субэтносах

Показатели	Субэтнотсы		
	южные	Горные	степные
\bar{k}	2,57	2,57	2,64
\bar{k}^2	6,63	6,59	6,99
σ^2_k	1,19	1,37	1,46
$I_f = \sigma^2_k / \bar{k}^2$	0,18	0,21	0,21
p_s	0,93	0,93	0,93
p_d	0,07	0,07	0,07
$I_m = p_d / p_s$	0,08	0,08	0,08
I_f / p_s	0,19	0,22	0,23
$I_{tot} = I_m + I_f / p_s$	0,27	0,30	0,30

Примечание: \bar{k} – среднее число потомков; σ^2_k – дисперсия числа потомков; I_f – дифференциальная плодовитость; p_s – доля индивидуумов, доживших до репродуктивного возраста; p_d – доля индивидуумов, умерших до репродуктивного возраста; I_m – дифференциальная смертность; I_{tot} – индекс тотального отбора.

Параметры естественного отбора у крымских татар типичны для современных популяций, характеризующихся гораздо более высоким индексом дифференциальной плодовитости по сравнению с индексом дифференциальной смертности при относительно небольшом значении индекса тотального отбора.

Авторы выражают благодарность Н.А.Козак за помощь в обработке материала.

Список литературы

Атраментова Л.А., Мещерякова И.П., Филиппова О.В. Репродуктивные характеристики и индекс Кроу в различных группах населения Евпатории // Генетика. – 2013. – Т.49, №12. – С. 1398–1406. /Atramentova L.A., Meshcheryakova I.P., Filiptsova O.V. Reproduktyvnyye kharakteristiki i indeks Krou v razlichnykh gruppakh naseleniya Yevpatorii // Genetika. – 2013. – Т.49, №12. – С. 1398–1406./

- Байысбекова А.Г. Популяционно-генетическая структура и генетическая дифференциация уйгурской сельской популяции республики Казахстан. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2012. – 22с. /Bayysbekova A.G. Populyatsionno-geneticheskaya struktura i geneticheskaya differentsiatsiya uygurskoy sel'skoy populyatsii respubliki Kazakhstan. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk. – M., 2012. – 22s./
- Березина Г.М., Святова Г.С., Абдуллаева А.М. Параметры репродукции в сельских популяциях Казахстана // Проблемы репродукции. – 2005. – Т.11, №3. – С. 24–29. /Berezina G.M., Svyatova G.S., Abdullayeva A.M. Parametry reproduksii v sel'skikh populyatsiyakh Kazakhstana // Problemy reproduksii. – 2005. – T.11, №3. – S. 24–29./
- Булаева К.Б., Курбатова О.Л., Павлова Т.А. и др. Генетико-демографическое исследование горских популяций Дагестана и мигрантов из них на равнину. Сравнение основных параметров приспособленности // Генетика. – 1995. – Т.31, №9. – С. 1300–1307. /Bulayeva K.B., Kurbatova O.L., Pavlova T.A. i dr. Genetiko-demograficheskoye issledovaniye gorskikh populyatsiy Dagestana i migrantov iz nikh na ravninu. Sravneniye osnovnykh parametrov prispособlennosti // Genetika. – 1995. – T.31, №9. – S. 1300–1307./
- Возгрин В.Е. Исторические судьбы крымских татар. – Москва: Мысль, 1992. – 246с. /Vozgrin V.Ye. Istoricheskiye sud'by krymskikh tatar. – Moskva: Mysl', 1992. – 246s./
- Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю.П.Алтухова. – М.: Наука, 2004. – С. 433–516. /Dinamika populyatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeystviyakh / Pod red. Yu.P.Altukhova. – M.: Nauka, 2004. – S. 433–516./
- Ельчинова Г.И., Шишко А.Н., Зинченко Р.А. Индекс Кроу и репродуктивная характеристика населения Татарстана // Генетика. – 2012. – Т.48, №7. – С. 872–879. /Yel'chinova G.I., Shishko A.N., Zinchenko R.A. Indeks Krou i reproduktivnaya kharakteristika naseleniya Tatarstana // Genetika. – 2012. – T.48, №7. – S. 872–879./
- Кривенцова Н.В. Популяционно-генетическая характеристика населения региона с высоким уровнем иммиграции (на примере Ростовской области). Дис. ... канд. биол. наук. – М., 2006. – 184с. /Kriventsova N.V. Populyatsionno-geneticheskaya kharakteristika naseleniya regiona s vysokim urovnem immigratsii (na primere Rostovskoy oblasti). Dis. ... kand. biol. nauk. – M., 2006. – 184s./
- Крымскотатарская энциклопедия / Авт.-сост. Р.Музафаров. – Симферополь: Ватан, 1993. – 426с. /Krymskotatarskaya entsiklopediya / Avt.-sost. R.Muzafarov. – Simferopol': Vatan, 1993. – 426s./
- Курбатова О.Л., Победоносцева Е.Ю., Гургенова Ф.Р., Булаева К.Б. Изменчивость параметров естественного воспроизводства и индекса Кроу в этнических группах Дагестана // Генетика. – 2012. – Т.48, №10. – С. 1221–1227. /Kurbatova O.L., Pobedonostseva Ye. Yu., Gurgenova F.R., Bulayeva K.B. Izmenchivost' parametrov yestestvennogo vosproizvodstva i indeksa Krou v etnicheskikh gruppakh Dagestana // Genetika. – 2012. – T.48, №10. – S. 1221–1227./
- Кучер А.Н., Курбатова О.Л. Популяционно-генетическое исследование дифференциальной плодовитости в городском населении // Генетика. – 1986. – Т.22, №2. – С. 304–311. /Kucher A.N., Kurbatova O.L. Populyatsionno-geneticheskoye issledovaniye differentsial'noy plodovitosti v gorodskom naselenii // Genetika. – 1986. – T.22, №2. – S. 304–311./
- Очерки истории и культуры крымских татар / Под. ред. Э.Чубарова. – Симферополь: Крымучпедгиз, 2005. – 208с. /Ocherki istorii i kul'tury krymskikh tatar / Pod. red. E.Chubarova. – Simferopol': Krymuchpedgiz, 2005. – 208s./
- Посух О.Л., Осипова Л.П., Крюков Ю.А., Ивакин Е.А. Генетико-демографический анализ популяции коренных жителей Самбургской тундры // Генетика. – 1996. – Т.32, №6. – С. 822–829. /Posukh O.L., Osipova L.P., Kryukov Yu.A., Ivakin Ye.A. Genetiko-demograficheskii analiz populyatsii korennykh zhiteley Samburgskoy tundry // Genetika. – 1996. – T.32, №6. – S. 822–829./
- Статистичний щорічник України. 2003 рік. – Київ: Консультант, 2004. – 631с. /Statystychnyy shchorichnyk Ukrainy. 2003 rik. – Kyiv: Konsul'tant, 2004. – 631s./
- Тимаков В.В., Курбатова О.Л. Значение индексов потенциального отбора для населения СССР // Генетика. – 1991. – Т.27, №5. – С. 928–937. /Timakov V.V., Kurbatova O.L. Znacheniy indeksov potentsial'nogo otbora dlya naseleniya SSSR // Genetika. – 1991. – T.27, №5. – S. 928–937./
- Тюркские народы Крыма: Караимы. Крымские татары. Крымчаки. – М.: Наука, 2003. – 459с. /Tyurkskiye narody Kryma: Karaimy. Krymskiye tatory. Krymchaki. – M.: Nauka, 2003. – 459s./
- Das F.A., Mithun S. Opportunity for natural selection among some selected population groups of Northeast India // Indian. J. Hum. Genet. – 2010. – Vol.16, no.2. – P. 61–66.
- Henrich J., Boyd R., Richerson P.J. The puzzle of monogamous marriage // Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2012. – Vol.367, no.1589. – P. 657–669.
- Kurbatova O.L., Pobedonostseva E.Yu., Privalova V.A. Strategies of adaptation: interpopulation selection differentials // J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci. – 2005. – Vol.24. – P. 363–365.

Представлено: О.В.Філіпцова / Presented by: O.V.Filipitsova
Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky
 Подано до редакції / Received: 24.10.2015

UDC: 575.21:57.044: 575.117.2:595.773.4

Variability of *Drosophila melanogaster* radius incompletus trait expressivity under the food fortification by folate-methionine cycle metabolites
N.Ye.Volkova, N.S.Filiponenko, L.I.Vorobyova

V.N.Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)
volkova_natalya@bk.ru

The aim of study was to determine how the excess of certain (key) metabolites of folate-methionine cycle (folic acid, methionine, betaine) in the diet affects *Drosophila melanogaster* radius incompletus trait expressivity. Folate metabolism is a supplier of one-carbon chemical groups to the number of vital cell processes (purine nucleotides biosynthesis, methionine regeneration, DNA, RNA and proteins methylation) and, therefore, it is directly related to the gene activity regulation. This prompted the supplements choice for study. For the experiment we used *D. melanogaster* stock with *radius incompletus* (*ri*) gene mutation. The expressivity of radius incompletus trait appeared to be a convenient model with well-studied genetic control to evaluate the effect of various factors. It has been established that an excess of folic acid, betaine or methionine in culture medium affects *D. melanogaster* radius incompletus trait expressivity. The direction and strength of effect depend on the sex of individual developed in the medium with one of mentioned supplements. Females appeared to be more sensitive. Each of the dietary supplements used was characterized by a specific effect on studied trait expressivity: under betaine influence we observed a significant decrease in the trait expression in females but not in males; under folic acid action sex-specific differences stayed stable; development in the medium with methionine excess resulted in a decrease of the studied index mean values with an increase of the individuals' variability. Evaluation in terms of fluctuating asymmetry proved more stable development of males in changing conditions, as compared to females.

Key words: metabolites of folate-methionine cycle, expressivity, radius incompletus trait, *Drosophila melanogaster*.

Мінливість експресивності ознаки radius incompletus *Drosophila melanogaster* при додаванні в їжу метаболітів фолатного-метіонінового циклу

Н.Є.Волкова, Н.С.Філіпоненко, Л.І.Воробйова

Дана робота мала на меті установити, яким чином надлишок деяких (ключових) метаболітів фолатно-метіонінового циклу (фолієва кислота, метіонін, бетаїн) в раціоні *Drosophila melanogaster* позначається на експресивності ознаки radius incompletus. Обмін фолатів є постачальником одновуглецевих хімічних груп для низки життєво важливих процесів клітини (біосинтез пуринових нуклеотидів, регенерація метіоніну, метилування ДНК, РНК, білків), а отже безпосередньо стосується регуляції активності генів. Саме це обумовило вибір домішок для проведення дослідження. Експеримент проводили із використанням лінії *D. melanogaster* з генною мутацією *radius incompletus* (*ri*). Експресивність ознаки *ri* виявилась зручною моделлю з добре вивченим механізмом генетичного контролю для оцінки впливу різних факторів. Встановлено, що надлишок фолієвої кислоти, метіоніну або бетаїну в поживному середовищі впливає на експресивність ознаки *ri* *D. melanogaster*. Напрямок та сила впливу залежать від статі особини, яка пройшла повний цикл розвитку на середовищі з домішкою, більш чутливими є самки. Кожна з уживаних домішок мала специфічний вплив на експресивність досліджуваної ознаки: під впливом бетаїну істотно знижувався прояв у самиць, але не у самців; за дії фолієвої кислоти у досліджуваній концентрації зберігаються стать-специфічні розбіжності у значеннях показника; на середовищі з метіоніном спостерігалось зниження середніх значень показника та збільшення варіативності особин за ним. Оцінка за показником флуктуючої асиметрії підтвердила більш стабільний розвиток самців в умовах, що змінюються, порівняно із самками.

Ключові слова: метаболіти фолатно-метіонінового циклу, експресивність, ознака radius incompletus, *Drosophila melanogaster*.

Изменчивость экспрессивности признака radius incompletus *Drosophila melanogaster* при добавлении в пищу метаболитов фолатно-метионинового цикла

Н.Е.Волкова, Н.С.Филипоненко, Л.И.Воробьева

Цель данной работы – установить, каким образом избыток некоторых (ключевых) метаболитов фолатно-метионинового цикла (фолиевая кислота, метионин, бетаин) в рационе *Drosophila melanogaster* сказывается

на експресивності признака *radius incompletus*. Обмен фолатов является поставщиком одноуглеродных химических групп для ряда жизненно важных процессов клетки (биосинтез пуриновых нуклеотидов, регенерация метионина, метилирование ДНК, РНК и белков), а, следовательно, непосредственно касается регуляции активности генов. Именно это обусловило выбор добавок для проведения исследования. Эксперимент проводили с использованием линии *D. melanogaster* с генной мутацией *radius incompletus* (*ri*). Экспресивность признака *ri* *D. melanogaster* оказалась удобной моделью с хорошо изученным механизмом генетического контроля для оценки влияния различных факторов. Установлено, что избыток фолиевой кислоты, метионина или бетаина (в заданных концентрациях) в питательной среде влияет на экспресивность признака *ri* *D. melanogaster*. Направление и сила действия зависят от пола особи, которая прошла полный цикл развития на среде с добавкой. Более чувствительными являются самки. Каждая из использованных добавок характеризовалась специфическим действием на экспресивность исследуемого признака: под воздействием бетаина существенно снизилось его проявление у самок, но не у самцов; при действии фолиевой кислоты в заданной концентрации сохраняются пол-специфические различия; на среде с метионином наблюдалось снижение средних значений изучаемого показателя при увеличении вариативности особей. Оценка по показателю флукутирующей асимметрии подтвердила более стабильное развитие самцов в изменяющихся условиях, по сравнению с самками.

Ключевые слова: метаболиты фолатно-метионинового цикла, экспресивность, признак *radius incompletus*, *Drosophila melanogaster*.

Introduction

At adaptation to changing environment the multicellular organism metabolism regulation is achieved by complex interactions between tissues and individual cells. One of the mechanisms of such interactions is the gene activity regulation by presence or absence of certain substances, as the expression of each gene is controlled by a complex interplay of hormonal, neuronal factors and factors of supply. The gene expression control by nutrients availability is well described in prokaryotes (Fafournoux et al., 2000; England et al., 2010) and in lower eukaryotes (De Caterina, Madonna, 2004). Similar studies are conducted in mammals. It has been shown that carbohydrates, fatty acids, sterols, as well as minerals and vitamins are involved in regulating the expression of individual genes (Towle, 1995; Fofelle et al., 1998; Pe'gorier, 1998; Vaulont et al., 2000; Duplus et al., 2000; Grimaldi, 2001). However, the mechanisms involved in the control of higher eukaryotes gene expression by components of the diet (especially by amino acids) are not fully understood (Fafournoux et al., 2000; Bruhat, Fafournoux, 2001; Kilberg, Barbosa-Tessmann, 2002; Mordier et al., 2002). The special importance of this type of regulation is that, on one hand, multicellular organisms cannot synthesize all the amino acids and, on the other one, they have no an amino acids depot (like for lipids or glucose) (Averous et al., 2003).

Folate-methionine cycle is a complex cascade process controlled by enzymes that utilize folic acid derivatives as coenzymes. It is an important part of the primary metabolism of cells because it is a supplier of one carbon chemical groups for a number of vital cellular processes, like purine nucleotides biosynthesis, methionine regeneration and DNA, RNA and proteins methylation, etc. The remains of one atom of carbon entering the folate-methionine metabolism, are formed in the catabolism of certain amino acids (serine, glycine, histidine), in choline catabolism, in the detoxification of formaldehyde and in utilization of formic acid and its salts (byproducts of cellular metabolism) (Michal, 1999). That's why we chose three important metabolites of this cycle (methionine, folic acid and betaine) to test their ability to influence trait expressivity in *Drosophila melanogaster*, probably through the regulation of correspondent gene expression.

Folic acid (pteroylglutamic acid, $C_{19}H_{19}N_7O_6$) is one of B group vitamins. It is built of 6-methylpteridine residue, para-aminobenzoic and L-glutamic acids ($M=441.4$ g/mol; $T_m=250^\circ C$). In foods (animal products, fresh herbs, yeast) it is found in conjugate form (folate), and only after the conversion (by the enzyme gamma-glutamyl hydrolase) in the body it acquires the capacity for absorption in the proximal small intestine, followed by folate monoglutamate restoration to tetrahydrofolic acid (THF) having vitamin activity (The vitamins..., 2008). Folate metabolism is known to affect DNA stability in two ways. The first one is de novo nucleotides synthesis. Low levels of 5,10-methylenetetrahydrofolate lead to thymidylate synthesis inhibition. As a result, the ratio dUMP/dTMP increases raising the likelihood of false incorporation of dUMP while DNA synthesis. Removing dUMP by DNA glycosylase can lead to single- and double-stranded breaks. Moreover unbalanced nucleotide pool interferes with the repair, resulting in DNA damage (Woods, 1964). The second way is to produce SAM (S-adenosylmethionine). The lack of SAM in the cell results in insufficient DNA methylation and, in turn, in violation of chromosome segregation and abnormal gene expression (Firso, Choi, 2005). Hypermethylation of tumor suppressor genes promoter regions (as well as hypomethylation of

promoter sites of proto-oncogenes, repeated DNA sequences, dispersed retrotransposons, endogenous retroviral elements, etc.) can cause selective growth and transformation of cells underlying carcinogenesis (Ma et al., 1999; Ehrlich, 2002; Fetisova et al., 2007). Folate deficiency and dysfunction of enzymes that metabolize homocysteine lead to accumulation of the last one in cells, as well as to an increased overall level of this compound in plasma (Davis, Uthus, 2004). Homocysteine has a strong toxic, atherogenic and thrombotic effects (Fetisova et al., 2007). Hyperhomocysteinemia and homocystinuria are also associated with increased risk of neural tube defects, ectopic lens, complications during pregnancy, osteoporosis (Kluijtmans et al., 2003; Dutta et al., 2005).

Methionine is one of the most important dietary compounds that are not synthesized in the body. It is one of the essential amino acids, so it must be constantly ingested with food. It is also usual first amino acid of the protein and the basis of many vital substances. Methionine in the body goes into the amino acid cysteine synthesis (as a sulfur source), which is a glutathione precursor. The latter is involved in toxins removal and protects the liver. Methionine is needed in the body under B12 vitamin deficiency. Violation of cysteine formation from methionine is one of the causes of neurological disorders in vitamin B12 deficiency. Methionine also serves as the chemical groups and elements source for the biosynthesis of epinephrine and choline. The lack of active methionine violates the synthesis of choline and choline-containing phospholipids (lecithin and sphingomyelin) which are nerve tissue components (Firro, Choi, 2005). The special role of this amino acid in metabolism is due to the fact that it contains moving methyl group (-CH₃), which can be transmitted to other compounds. In connection with such broad metabolic demand, methionine is often used in many human diseases and conditions treatment (Steinberg, 1984; Lieber, 2002; Krzystanek et al., 2011).

Betaine (trimethylglycine) is a natural compound (discovered by C.Scheibler in sugar beet (*Beta vulgaris*) juice in 1866) that is found in animals and plants. For the time betaine was thought to be completely inactive. But later it was found that as a component of food for farm animals and birds it plays a significant role of labile methyl groups source for homocysteine methylation in the liver (Craig, 2004). The body of birds and animals cannot synthesize methyl groups, and pulls them with nutrition only. Moreover, in birds, for example, there is no choline oxidase for betaine production (Zeisel et al., 2003; Craig, 2004), so its role as a full feeding factor equals in importance to the presence of vitamins and other biologically useful compounds in food. In addition, compared with other compounds, the efficiency of betaine is higher because it is an active methylating form of choline (Obeid, 2013; Wang et al., 2014). That is it may be an alternative way for normal methylation reactions and it functions as an alternative methyl groups donor in the recovery of methionine from homocysteine. Thus, betaine can replace defects in methylation reactions caused by malfunction of folate cycle or by the lack of vitamin B12. Betaine is the only known source of methyl groups for this key pathway. In the case of folate cycle violations (failure, methotrexate induced depression) participation of betaine in the homocysteine transformation to methionine becomes decisive (Obeid, 2013; Wang et al., 2014). Betaine can also replace SAM as a donor of methyl groups for direct methylation of phosphatidylethanolamines that is an alternative way of phosphatidylcholine formation. It is believed that due to the involvement into these two reactions betaine affects intermediate metabolism.

As far as *D. melanogaster* was used as a model organism we have checked for some evidence that substances added to the larvae culture medium (amino acids – modified glycine and methionine – and folic acid) affect flies longevity and fertility. As to the folic acid effects in *D. melanogaster* the information is contradictory. There are publications that favor the ability of fruit flies to synthesize this vitamin (Venters, 1971). However, there is also an idea that folate synthesis in insects depends on their germ endosymbiotic microorganisms (Douglas et al., 2001). The other group of scientists (Grandison et al., 2009) defined the particular impact of methionine in flies longevity and fertility. The addition of 10 essential amino acids to the dietary feed in various combinations led to the following effects: if the amount of methionine is the "standard" the fertility will be high, if the amount of methionine is the "dietary" the fertility will be low, in spite of the amount of other amino acids. Longevity, on the contrary, was reduced in flies reared in the medium with "standard" amount of methionine and other essential amino acids. All other combinations: (1) high methionine, low others; (2) low methionine, high others; (3) both low – resulted in a long life. What exact essential amino acids methionine interacts with the authors could not figure out. Apparently, the interaction between the components of the food is obviously quite complex (Grandison et al., 2009).

The key folate-methionine cycle metabolites (amino acid methionine, a derivative of the amino acid glycine – betaine, and folic acid) were selected for the study because the folate exchange is a supplier of one carbon atom chemical groups for a number of vital cellular processes such as purine nucleotides

biosynthesis, methionine regeneration and DNA, RNA and proteins methylation, and the balance of amino acids and vitamins affects flies longevity and fertility.

Quantitative traits genetics is one of the traditional lines of classic genetic research. Due to high genetic complexity of quantitative traits it is, for now, behind other genetic branches. Except the lack of information about the mechanisms of genetic control of quantitative traits, the ways of their formation in individual development, population dynamics responses to direct and indirect pressure of artificial selection and the role in the species evolution are also insufficiently explored. Here we will analyze *radius incompletus* trait expressivity as a quantitative trait resulted from gene mutation that violates venation of *D. melanogaster* wing plate.

The second radial wing vein of *D. melanogaster* is a good model for quantitative traits studying. It is the last of longitudinal wing veins being formed at prepupa stage. The *radius incompletus* (*ri*) mutation is one of a series of *knirps* gene alleles, located in 3–47.0. It suppresses the formation of central part of radial (L2) wing vein. Instead, the normal allele of this gene (*knirps*) provides a complete vein formation. The length of the distal and proximal sites varies depending on genetic and environmental factors (Ratner, Vasil'eva, 2000; Zakharenko et al., 2010). This mutation is actively investigated because it is an example of a complex pattern of a quantitative trait inheritance. It is assumed that this system contains a gene of main effect limiting trait morphogenesis (classical Mendelian gene), polygenes affecting main effect gene expression, and mobile genetic elements (MGE). It is consistent with modern views on a typical genetic system of quantitative trait determination:

1) Oligogene (or main effect gene), that is required for the formation of trait. If oligogene limits characteristics formation in morphogenesis, its manifestation becomes dependent on polygenes influences.

2) Polygenic modifiers, each of which is not necessary for the trait formation, but together they can alter the expressivity significantly. It is important that polygenic modification is applicable only to certain oligogenes. In other words, only in this case the phenomenon of incomplete penetrance and variable expressivity appears. Among the properties of polygenes we can mention their dispersed distribution through the genome, a small individual effect on the trait, the lack of their own distinct phenotypic manifestations, allelic diversity. Various polygenes make different contributions into the trait formation, and these contributions can be multidirectional. The system of gene *knirps* expression is thought to be an example of classic polygenic system (Ratner, Vasil'eva, 2000).

3) MGE. There are several hypotheses of MGE influence on traits manifestation: the hypothesis of MGE genetic drift at selection; the hypothesis of modifier MGE influence on the mode of complex polygenes display as far as MGE include functional sites potentially interfering nearby (and other) genes; the hypothesis of the "pattern-champion" of polygenes that contributes significantly to the quantitative trait phenotype whereas MGEs act as markers that are subjected to selection (Ratner et al., 2003). Polygenic structure and MGE start to affect the expression only when some oligogene becomes the one who limits the expression (Vasilyeva et al., 2008; Ratner et al., 2003). The system of different MGE patterns can be analyzed as a universal genomic system of "soft" control for polygenic quantitative traits modifications, including expressivity.

Thus, based on the above, the aim of this work is to establish how the excess of some folate-methionine cycle metabolites in *D. melanogaster* diet affects the expressivity of *radius incompletus* trait.

Materials and methods

As the material for the study we used *D. melanogaster radius incompletus* – *knirps*^{*radius incompletus*} – stock from the Collection of drosophila stocks of Genetics and Cytology Department of V.N.Karazin Kharkiv National University that is among objects of Ukraine National Heritage. This mutation is characterized by 100% penetrance and variable expressivity. The stock used is characterized by stable phenotypic manifestation: the presence of proximal part of radial wing vein only (Fig. 1).

Individuals from the control group were reared on the standard corn-meal medium under the constant temperature ($t=23\pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity conditions. To simulate the excess of folate-methionine cycle components in feeding medium the following supplements were used: pharmacological drug "Folic Acid" (Acidum Folicum) produced by "Technologist" (c. Uman), tablets of 0.005 g (composition: active ingredient – folic acid; supporting ingredients – potato starch, sugar, calcium stearate), was added to the culture medium in its final concentration for feeding larvae 1 mg/ml; pharmacological drug "Methionine" produced by "Kyiv Vitamin Factory", coated tablets (composition: active substance – methionine 250 mg; supporting ingredients – potato starch 44 mg, methylcellulose 3 mg, stearic acid 3 mg, wheat 18.556 mg, sucrose

62.486 mg, magnesium carbonate 18.264 mg, talc 0.496 mg, refined sunflower oil 0.097 mg, beeswax 0.097 mg, azorubine 0.004 mg), washed from the coat before addition to the culture medium in its final concentration for feeding larvae 1 mg/ml; biologically active supplement "Betaine" (Finland), yellowish powder (composition: active ingredient – trimethylglycine; supporting ingredients – inositol), was added to the culture medium in its final concentration for feeding larvae 5%. The active drug concentrations were established experimentally (Volkova et al., 2010, 2013).

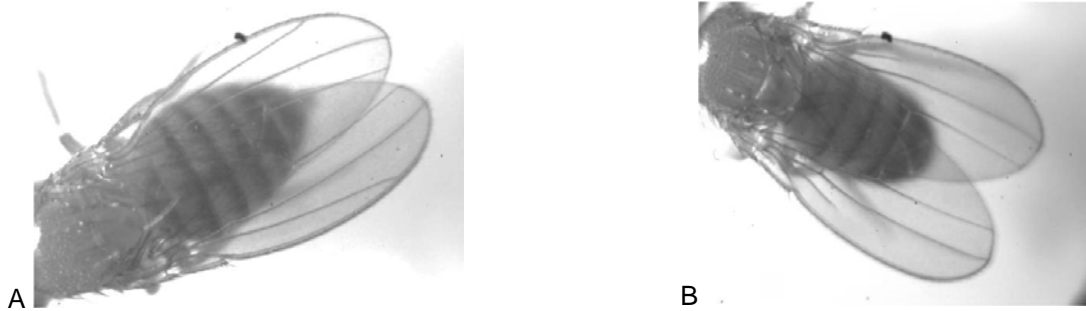


Fig. 1. The phenotypes of *Drosophila melanogaster*: A. wild type; B. radius incompletus (×20)

ri trait expressivity was evaluated in imagoes survived in the medium with supplement, or control by the ratio of the L2 proximal fragment length to the projection of its full length. The result was expressed as a fraction. The measurements were carried out in photographs of imagoes made using a stereoscopic microscope (Delta Optical NTX-3C), digital camera (Sigeta UCMOS 3100 3.1MP) and Image analysis® software. Image processing was performed using the ImageJ® software. For each group of comparison from 20 to 73 measurements were done. Totally there were 16 groups of comparison depending on the sex of individual, left or right wing, nature of supplement. The total number of examined veins was 740. For the parameter measured an arithmetic average and its error (through the standard deviation) were calculated. To evaluate the impact of various factors on the studied characteristic variation ANOVA was used. The power of factors influences (η^2) was evaluated by Plokhinskiy method (Atramentova, Utevska, 2007). To analyze statistical relationships between characteristics measured Spearman correlation was used. Statistica 6.0® was used for calculations.

The level of developmental stability of *Drosophila* individuals under the effect of factors was studied by the indicator "fluctuating asymmetry." This indicator was calculated by one of the commonly used formulas for each experimental group, for males and females separately (Zakharov, 1982):

$$\delta_d^2 = \frac{\sum (d_{l-r} - M_d)^2}{n-1}, \quad \text{where: } M_d = \frac{\sum d_{l-r}}{n} \quad d_{l-r} = \frac{2(d_l - d_r)}{d_l + d_r}$$

– mean difference between sides; – difference of trait values between left (l) and right (r) sides.

Results and discussion

The impact of folate-methionine cycle metabolites excess on *Drosophila radius incompletus* trait expressivity

The analysis of experimental data established sex-specific reaction of *D. melanogaster* individuals on various supplements to the culture medium (Fig. 2). For example, among the females of control group we observed an asymmetry in the manifestation of trait studied, the average ri expressivity in the left wing was 0.33 ± 0.02 , and in the right one 0.30 ± 0.01 . At betaine and methionine supplements these differences passed away. In the case of betaine supplement the expressivity varied as 0.32 ± 0.004 and 0.31 ± 0.004 for the left and right wings respectively. In the case of methionine it was 0.32 ± 0.01 for each of the wings. In the case of the development in the medium with the folic acid excess the expressivity of trait studied in females enhanced (0.35 ± 0.01 and 0.36 ± 0.01 for the left and right wings respectively) compared with the control group, but the asymmetry disappears.

Males in the control group, by contrast, are characterized by more homogeneous values of the index (in the left wing 0.31 ± 0.01 ; in the right wing 0.32 ± 0.01). Rearing in the medium with betaine excess did not

lead to significant changes (0.31 ± 0.003 in both wings). As a folic acid effect we observed elevation of the asymmetry in trait manifestation. In the experimental group the average expressivity on the left wing was 0.33 ± 0.01 , and in the right one 0.31 ± 0.01 . At the same time, the methionine excess also led to increased asymmetry, but with lower means (0.31 ± 0.01 and 0.30 ± 0.01 for the left and right wings respectively).

ANOVA confirmed the effect of medium supplement ($F=10.80$, $p<0.05$), of sex of individuals ($F=24.75$, $p<0.05$) and of these two factors interaction ($F=3.59$, $p<0.05$) on the ri trait expressivity (Table 1).

Moreover, among the factors in this experiment the presence of some supplement in the medium had the most powerful effect on ri expressivity ($\eta^2=0.04$; $p<0.05$). The second effect size we observed for the sex of individual ($\eta^2=0.03$; $p<0.05$). The weakest effect the interaction of these two factors had ($\eta^2=0.01$; $p<0.05$). Despite the fact that the strength of the impact of these factors is rather small, it is in each case is statistically significant. So folate-methionine cycle metabolites studied modify the expressivity of *radius incompletus* trait in *D. melanogaster* and, possibly, the expression of the corresponding gene. The low values of effect powers may indicate the influence through some intermediaries (modifier genes and their products).

The analysis of each supplement effects separately showed the following. The adding of betaine (5%) to the nutrient medium reduces the manifestation of ri trait in females significantly but not in males (Fig. 3, A). ANOVA revealed the statistically significant effect of supplement presence ($F=13.87$, $p<0.05$), of sex ($F=14.84$, $p<0.05$) and of these two factors interaction ($F=6.49$, $p<0.05$) on the trait expressivity.

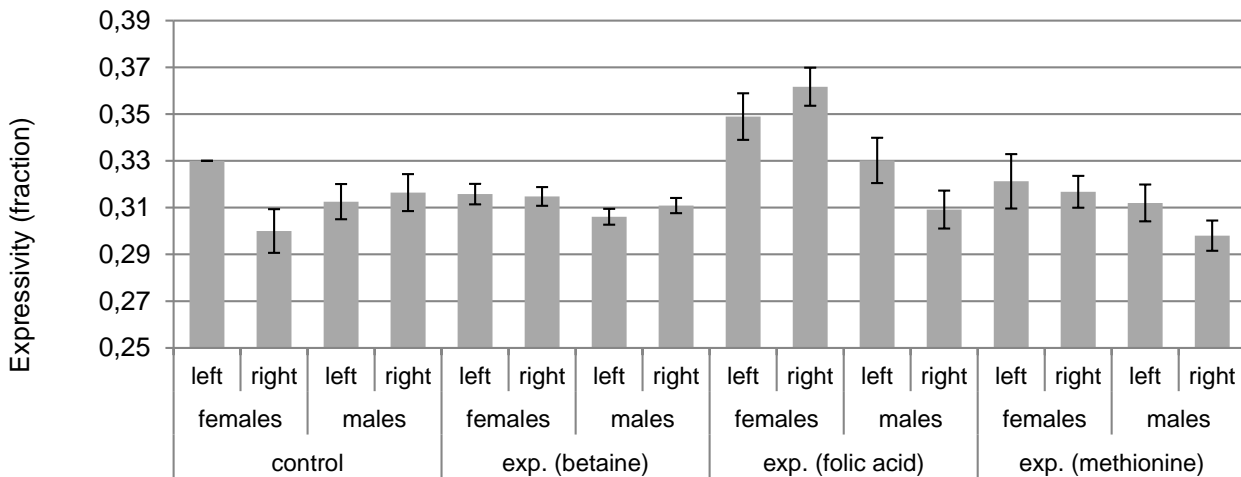


Fig. 2. Variation of *radius incompletus* trait expressivity depending on folate-methionine cycle metabolites excess in the medium

Table 1.

The effect of various factors on *radius incompletus* trait expressivity (ANOVA results)

	SS	D. F.	MS	F	p
Supplement	0,097	3	0,033	10,80	<0,05
Sex	0,074	1	0,074	24,75	<0,05
Wing	0,003	1	0,003	1,08	>0,05
Supplement VS Sex	0,032	3	0,011	3,59	<0,05
Supplement VS Wing	0,003	3	0,001	0,36	>0,05
Sex VS Wing	0,001	1	0,001	0,18	>0,05
Supplement VS Sex VS Wing	0,020	3	0,007	2,22	>0,05
Uncontrollable factors	2,178	725	0,003		

Note: SS – uncorrected variance (sum of squares); D. F. – degrees of freedom; MS – corrected variance (mean square); F – Fisher criterion; p – level of significance.

The folic acid supplement (1 mg/ml) led to increased means of parameter studied both in males and females. But these changes were accompanied by high level of variability and thus the most pronounced were sex differences with higher values for females (Fig. 3, B). ANOVA showed a statistically significant effect of the sex on expressivity ($F=22.342$, $p<0.05$), but showed neither supplement presence nor the influence of these two factors interaction. This fact requires further study. By the way, the hypervitaminosis by folic acid, in insects particular, is rarely discussed in the literature. As to *D. melanogaster* specifically, despite its widespread use as a genetic model organism, many aspects of its folate metabolism are still not clear. First, the controversial ability of insects to synthesize folates that was mentioned above (Venters, 1971). In addition, there are studies showing an increase in vitality, fertility, growth and intensity of fruit flies development at higher folate levels. In the case of folate absence in food, they cannot finish their metamorphosis (Singh, Brown, 1957; Golberg et al., 1945). The same authors but later showed that if the food of an adult female contains no folate the most of eggs she produces would be nonviable (Sang, King, 1961). Other authors found that in this species the need in folates derived from food increases when larvae are reared in the medium with low concentration of nucleic acids, high concentration of proteins and glycine, or reduced serine content (Geer, 1963). And, of course, a variety of negative effects of the folate inhibitors proves the important role of folic acid in securing many biological functions in *Drosophila* (Affleck et al., 2006).

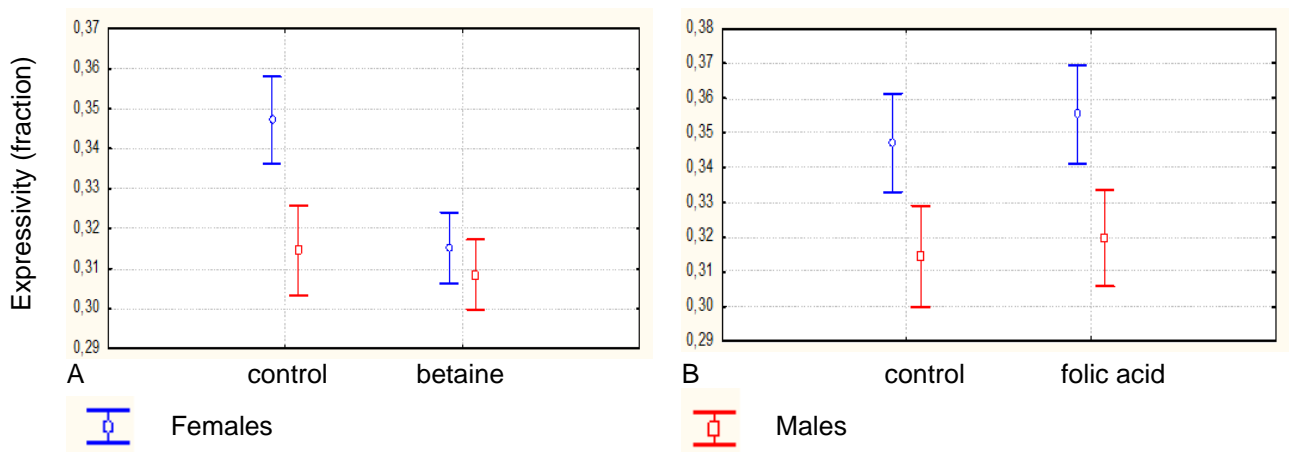


Fig. 3. The effect of betaine (A) and folic acid (B) on *D. melanogaster radius incompletus* trait expressivity

Methionine supplement at 1 mg/ml concentration reduced the means of parameter studied both in males and females. But, as in the case of folic acid effect, we observed considerable variability in the trait manifestation accompanied even by disappearance of sex differences (Fig. 4). ANOVA showed statistically significant impact of methionine presence ($F=4.417$, $p<0.05$) and gender ($F=6.454$, $p<0.05$) factors on the ri expressivity, but did not reveal the effect of the these two factors interaction.

Based on the results, we can say that of three studied folate-methionine cycle metabolites betaine has the most effective influence on the radius incompletus trait expressivity. Presumable reason is that betaine (trimethylglycine) has three labile methyl groups and is a derivative of the simplest amino acid involved in the synthesis of many other amino acids.

The lack of statistically significant impact of the factor "wing" (left or right) and of the interaction of this factor with the other in any combination (Table 1) establishes the fact that the fluctuating asymmetry exactly takes place in manifestation of *D. melanogaster radius incompletus* trait. Therefore, this feature can be used for biological indication. Especially because *D. melanogaster* is a cosmopolitan species, living synanthropically and thus individuals are exposed to the same factors that people in the same areas.

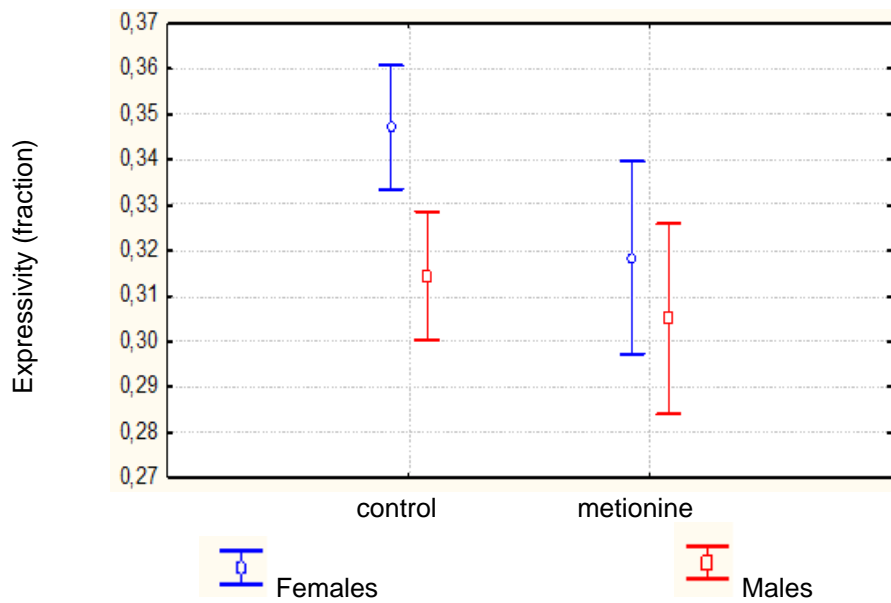


Fig. 4. The methionine effect on *D. melanogaster* *radius incompletus* trait expressivity

The effect of folate-methionine cycle metabolites excess on developmental stability of drosophila individuals

According to the value of *radius incompletus* trait expressivity we calculated (Table 2) the index of fluctuating asymmetry for females and males separately for each experimental group (Zakharov, 1982). This index characterizes the stability of organism development (Graham et al., 2010). The developmental stability as the ability of the body to develop without abnormalities is the indicator of natural population state. The most accessible way to evaluate the stability level is the determination of fluctuating asymmetry of bilateral morphological characters (Sokolova, Sharlayeva, 2006). But by this indicator one can consider only the stability in respect to certain characteristic. After the analysis of a large number of different structures it becomes possible to reveal general patterns, common for the group of features that vary, that to some extent may allow to determine the stability of development of organisms as a whole (Zakharov, 1982).

Table 2. Fluctuating asymmetry coefficient for the *radius incompletus* trait expressivity under the use of various supplements

Experimental group	Sex	Fluctuating asymmetry coefficient
Control	Females	0.066
	Males	0.034
Betaine	Females	0.014
	Males	0.013
Folic acid	Females	0.484
	Males	0.072
Methionine	Females	0.035
	Males	0.026

In populations existing in certain environmental conditions through rather long period a certain level of developmental stability is maintained (Shadrina, Volpert, 2006). Abnormalities are usually observed in populations existing at the limit of species ecological capabilities, as well as in the area of hybridization of different forms, adapted to different environmental conditions. Nonspecificity of the reaction such as instability in response to different changes of environmental conditions allows using this characteristic for bioindication of anthropogenic effects on the environment (Zakharov, 1982).

Our results suggest that the development of *Drosophila* males (in particular the formation of their wing venation) is more stable comparatively to females under the conditions of excess of certain folate-methionine cycle metabolites in the nutrient medium.

We also calculated the correlation (Spearman correlation coefficient) between the average value of expressivity index of radius incompletus trait and fluctuating asymmetry coefficient ($r_s=0.88$; $p=0.003$). That is there is a statistically significant strong direct relationship between two indexes measured under the experimental conditions. Thus, based on the results obtained in this experiment, certain folate-methionine cycle metabolites excess in larval nutrient medium has sex-specific effect on the degree of manifestation of radius incompletus mutation in *D. melanogaster*.

Conclusions

D. melanogaster radius incompletus trait expressivity is a convenient model with well-studied mechanism of genetic control and can be used to evaluate the effects of various factors. Changing the diet by addition of folate-methionine cycle components to the nutrient medium affects the radius incompletus trait expressivity in *D. melanogaster* ($F=10.80$, $p<0.05$). The direction and force of the effect depends on the sex ($F=24.75$, $p<0.05$) of the individual who passed the full cycle of development in the environment with the supplement. Females are more sensitive. Each of the supplements used is characterized by a specific effect on the trait expressivity: betaine (5%) significantly reduces the manifestation in females but not in males; under the folic acid (1 mg/ml) sex-specific differences are kept; methionine (1 mg/ml) reduces the average values of parameters studied but increases the variability of individuals. The analysis in terms of fluctuating asymmetry confirmed more stable development of males in changing conditions (with the addition of folate-methionine cycle metabolites) comparatively to females.

References

- Atramentova L.O., Utevska O.M. Statistical methods in biology: Manual. – Kh.: VN Karazin KhNU, 2007. – 288 p. (in Ukrainian)
- Affleck J.G., Neumann K., Wong L., Walker V.K. The effects of methotrexate on *Drosophila* development, female fecundity, and gene expression // *Toxicol. Sci.* – 2006. – Vol.89, Iss. 2. – P. 495–503.
- Averous J., Bruhat A., Mordier S., Fafournoux P. Recent advances in the understanding of amino acid regulation of gene expression // *J. Nutr.* – 2003. – Vol.133. – P. 2040S–2045S.
- Bruhat A., Fafournoux P. Recent advances on molecular mechanisms involved in amino acid control of gene expression // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2001. – Vol.4. – P. 439–443.
- Craig S. Betaine in human nutrition // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – Vol. 80, no 3. – P. 539–549.
- Davis C.D., Uthus E.O. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions // *Experimental biology and medicine.* – 2004. – Vol.229, no 10. – C. 988–995.
- De Caterina R., Madonna R. Nutrients and gene expression / in *Nutrigenetics and nutrigenomics* / eds. A.P.Simpopoulos, M.J.Ordoas. – 2004. – Vol.93. – P. 99–133.
- Douglas A.E., Minto L.B., Wilkinson T.L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid // *J. Exp. Biol.* – 2001. – Vol.204. – P. 349–358.
- Duplus E., Glorian M., Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol.275. – P. 30749–30752.
- Dutta S., Sinha S., Chattopadhyay A. et al. Cystathionine beta-synthase T833C/844INS68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children // *Behav. Brain Funct.* – 2005. – Vol.1. – 25p. (<http://behavioralandbrainfunctions.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-9081-1-25>)
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little // *Oncogene.* – 2002. – Vol.21, no 35. – P. 5400–5413.
- England J.C., Perchuk B.S., Laub M.T., Gober J.W. Global regulation of gene expression and cell differentiation in *Caulobacter crescentus* in response to nutrient availability // *J. Bacteriol.* – 2010. – Vol.192, iss.3. – P. 819–833.
- Fafournoux P., Bruhat A., Jousse C. Amino acid regulation of gene expression // *Biochem. J.* – 2000. – Vol.351. – P. 1–12.
- Fetisova I.N., Dobrolyubov A.S., Lipin M.A., Polyakov A.V. The polymorphism of folate metabolism genes and human diseases // *The Journal of New Medical Technologies.* – 2007. – Vol.10, no 1. – P. 12–17. (in Russian)

- Firso F., Choi S.-W. Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism // *Current Drug Metabolism*. – 2005. – Vol.6. – P. 37–46.
- Foufelle F., Girard J., Ferre P. Glucose regulation of gene expression // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. – 1998. – Vol.1. – P. 323–328.
- Geer B.W. A ribonucleic acid-protein relationship in *Drosophila* nutrition // *J. Exp. Zool.* – 1963. – Vol.154. – P. 353–364.
- Graham J.H., Raz S., Hel-Or H., Nevo E. Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications // *Symmetry*. – 2010. – Vol.2. – P. 466–540.
- Grandison R.C., Piper M.D.W., Partridge L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila* // *Nature*. – 2009. – Vol.462. – P. 1061–1064.
- Grimaldi P.A. Fatty acid regulation of gene expression // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. – 2001. – Vol.4. – P. 433–437.
- Golberg L., de Meillon B., Lavoipierre M. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* L. II. Essential watersoluble factors from yeast // *J. Exp. Biol.* – 1945. – Vol.21. – P. 90–96.
- Kilberg M.S., Barbosa-Tessmann I.P. Genomic sequences necessary for transcriptional activation by amino acid deprivation of mammalian cells // *J. Nutr.* – 2002. – Vol.132. – P. 1801–1804.
- Kluitmans L.A.J., Young I.S., Boreham C.A. et al. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults // *Blood*. – 2003. – Vol.101, no 7. – P. 2483–2488.
- Krzystanek M., Pałasz A., Krzystanek E. et al. S-adenosyl L-methionine in CNS diseases // *Psychiatria Polska*. – 2011. – Vol.XLV, no 6. – P. 923–931. (in Polish)
- Lieber C.S. S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2002. – Vol.76, iss.5. – P. 1183S–1187S.
- Ma J., Stampfer M.J., Christensen B. et al. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocysteine, and colorectal cancer risk // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. – 1999. – Vol.8, no 9. – P. 825–829.
- Michal G. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. – New York: John Wiley and Sons Inc., 1999. – P.399.
- Mordier S., Bruhat A., Averous J., Fafournoux P. Cellular adaptation to amino acid availability: mechanisms involved in the regulation of gene expression and protein metabolism / In: *Cell and Molecular Responses to Stress*. Vol.3. Sensing, Signaling and Cell Adaptation / Eds. K.M.Storey, J.M.Storey. – New York: Elsevier Science, 2002. – P. 189–206.
- Obeid R. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway // *Nutrients*. – 2013. – Vol.5, iss.9. – P. 3481–3495.
- Pe'gorier J.P. Regulation of gene expression by fatty acids // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. – 1998. – Vol.1. – P. 329–334.
- Ratner V.A., Vasil'eva L.A. Induction of mobile genetic elements transpositions by stress effects // *Soros Educational Journal*. – 2000. – Vol.6, no 6. – P. 14–20. (in Russian)
- Ratner V.A., Egorova A.V., Iudanin A.Ya. Stabilizing selection and computer models of the joint evolution of patterns of polygenes, transposable elements, and origin identity labels // *Genetika*. – 2003. – Vol.39, no 4. – P. 550–561. (in Russian)
- Sang J.H., King R.C. Nutritional requirements of axenically cultured *Drosophila melanogaster* adults // *J. Exp. Biol.* – 1961. – Vol.38. – P. 793–809.
- Singh K.R.P., Brown A.W.A. Nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. // *J. Insect. Physiol.* – 1957. – Vol.1. – P. 199–220.
- Shadrina E.G., Volpert Ya.L. Nature puts diagnosis // *Ecology and life*. – 2006. – No 2. – P. 60–63. (in Russian)
- Sokolova G.G., Sharlayeva E.A. Workshop on bioindication of the ecological state of the environment. – Barnaul, 2006. – 109p.
- Steinberg S.E. Mechanisms of folate homeostasis // *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1984. – Vol.246. – G319–G324.
- The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health / Ed. F.C.Gerald. – 2008. – P. 355–380.
- Towle H.C. Metabolic regulation of gene transcription in mammals // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol.270. – P. 23235–23238.

- Vasilyeva L.A., Antonenko O.V., Vykhristyuk O.V., Zakharov I.K. Selection changes the pattern of mobile genetic elements in genome of *Drosophila melanogaster* // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2008. – Vol.12, no 3. – P. 412–425.
- Vaulont S., Vasseur-Cognet M., Kahn A. Glucose regulation of gene transcription // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol.275. – P. 31555–31558.
- Venters D. Folate synthesis in *Ae. aegypti* and *Drosophila melanogaster* larvae // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1971. – Vol.65. – P. 687–688.
- Volkova N.Ye., Philiponenko N.S., Kostenko V.V. et al. Changes of *Drosophila melanogaster* quantitative traits at the influence of the donor of methyl groups – betaine. I. An analysis of adaptability components and expressiveness of the trait radius incompletus // The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: biology. – 2010. – Vol.12, iss. 920. – P. 10–25. (in Russian)
- Volkova N.Ye., Filiponenko N.S., Krasovska V.V. et al. Effect of the folic acid and methionine on *Drosophila melanogaster* fitness // The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: biology. – 2013. – Vol.17, iss.1056. – P. 62–73. (in Russian)
- Wang Z., Tang W.H.W., Buffa J.A. et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-*N*-oxide // Eur. Heart. J. – 2014. – Vol.35, iss.14. – P. 904–910.
- Woods D.D. The function of folic acid in cellular metabolism // Proc. R. Soc. Med. – 1964. – Vol.57. – P. 388–390.
- Zakharenko L.P., Perepelkina M.P., Vasil'eva L.A. Change in the distribution of transposable elements in isogenic strain--cause or consequence in *Drosophila melanogaster* selection for quantitative traits? // Tsitologiya. – 2010. – Vol.52, no 6. – P. 487–492. (in Russian)
- Zakharov V.M. Phenogenetic aspect of natural populations study // Populations Phenetics. – M., 1982. – P. 86–94. (in Russian)
- Zeisel S.H., Mar M.-H., Howe-J.C., Holden J.M. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods // J. Nutr. – 2003. – Vol.133, no 5. – P. 1302–1307.

Представлено: Т.О.Єлецька / Presented by: T.O.Yeletska
Рецензент: О.В.Горенська / Reviewer: O.V.Gorenskaya
Подано до редакції / Received: 30.03.2016

УДК: 575.21:57.042

Особенности адаптивного ответа на кратковременное воздействие крайневисокочастотного облучения линий *Drosophila melanogaster*, несущих мутацию *black*

О.В.Горенская¹, Ю.Г.Шкорбатов¹, А.Б.Гаврилов²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Метрологический центр военных эталонов ВС Украины (Харьков, Украина)
 olgavg@bk.ru

В работе изучалось влияние крайневисокочастотного (КВЧ) излучения на проявление некоторых адаптивно важных признаков у дрозофилы. Использовалась линия дикого типа *Canton-S* (C-S), мутантные линии *black* (b) и *black_{Canton-S}* (b_{C-S}). Внешнему воздействию с частотой 37,7 ГГц, мощностью 10 мкВт и 100 мкВт подвергались мухи в период раннего эмбриогенеза. Результаты работы показали, что кратковременное воздействие микроволнового излучения увеличивает продолжительность предимагинального развития и снижает устойчивость имаго к голоданию. При этом доля особей, погибших на стадии куколки, достоверно не отличалась от уровня контроля во всех вариантах эксперимента. Скорость предимагинального развития зависит в большей степени от внешнего воздействия ($h^2_{♀}=13,86\%$, $h^2_{♂}=18,48\%$). Основным фактором, определяющим продолжительность жизни при голодании особей, подвергшихся воздействию КВЧ на стадии яйца, является генотип ($h^2_{♀}=43,42\%$, $h^2_{♂}=59,52\%$).

Ключевые слова: КВЧ, дрозофила, предимагинальное развитие, длительность жизни при голодании.

Особенности адаптивної відповіді на короткочасний вплив надвисокочастотного випромінювання ліній *Drosophila melanogaster*, що несуть мутацію *black*

О.В.Горенська, Ю.Г.Шкорбатов, А.Б.Гаврилов

У роботі вивчався вплив надвисокочастотного (НВЧ) випромінювання на прояв деяких адаптивно важливих ознак у дрозофіли. Використовувалася лінія дикого типу *Canton-S*, мутантні лінії *black* і *black_{Canton-S}*. Зовнішньому впливу з частотою 37,7 ГГц, потужністю 10 мкВт і 100 мкВт піддавалися мухи в період раннього ембріогенезу. Результати роботи показали, що короткочасний вплив мікрохвильового випромінювання збільшує тривалість передімагінального розвитку і знижує стійкість имаго до голодування. При цьому частка особин, які загинули на стадії лялечки, вірогідно не відрізнялися від рівня контролю у всіх варіантах експерименту. Швидкість передімагінального розвитку залежить більшою мірою від зовнішнього впливу ($h^2_{♀}=13,86\%$, $h^2_{♂}=18,48\%$). Основним фактором, що визначає тривалість життя при голодуванні особин, які зазнали впливу НВЧ на стадії яйця, є генотип ($h^2_{♀}=43,42\%$, $h^2_{♂}=59,52\%$).

Ключові слова: НВЧ, дрозофіла, передімагінальний розвиток, тривалість життя при голодуванні.

Features of the adaptive response to the short-term influence of microwave radiation in *Drosophila melanogaster* stocks with *black* mutation

O.V.Gorenskaya, Y.G.Shckorbatov, A.B.Gavrilov

The influence of extremely high frequency (EHF) radiation with wave frequency 37.7 GHz, power density 10 μ W and 100 μ W on formation of *Drosophila melanogaster* some important adaptive traits has been studied. We used wild type stock *Canton-S*, *black* and *black_{Canton-S}* mutant stocks. It has been shown that short-term exposure of *Drosophila* eggs to the microwave radiation increases the duration of preimaginal stage and reduces the resistance of adults to starvation. The part of larvae died at the pupal stage do not significantly differ from the control level in all experimental variants. The preimaginal development rate depends largely on external influence ($h^2_{♀}=13,86\%$, $h^2_{♂}=18,48\%$). The main factor determining the lifespan of flies under starvation after the action of microwaves is genotype ($h^2_{♀}=43,42\%$, $h^2_{♂}=59,52\%$).

Key words: EHF, *Drosophila*, preimaginal development, life span during starvation.

Введение

Крайневысокочастотное (КВЧ) излучение – разновидность электромагнитного излучения (ЭМИ), которое включает в себя Ка-диапазон, используемый, в основном, для спутниковой радиосвязи и радиолокации. Этот диапазон простирается от 26,5 до 40 ГГц. Спутники Ка-диапазона идеально подходят для обеспечения доступа в сеть Интернет и открывают новые возможности для развития отрасли спутниковых коммуникаций. В ближайшем будущем планируется более широкое внедрение Ка-диапазона на мобильных платформах, таких как поезда, самолеты и автобусы, транспорт служб экстренного реагирования и вооруженные силы (Рытенкова, 2015). Как очевидное следствие – усиление электромагнитного поля (ЭМП) антропогенного происхождения. Это искусственно созданное ЭМП является новым, не достаточно изученным фактором окружающей среды (Коршунов и др., 2004). В частности, интерес представляет адаптивный ответ на внешнесредовой стрессовый фактор в зависимости от генотипа особей (Шкорбатов, Шахбазов, 2000).

В качестве модели для проведения исследований выбрана плодовая муха *Drosophila melanogaster*. Одна из важных характеристик этого объекта – фенотипическое проявление мутаций, блокирующих основные метаболические пути. Использование дрозофилы оказалось плодотворным при исследовании механизмов влияния на комплекс адаптивно важных признаков различных стрессовых воздействий, таких как экстремальные температуры, ионизирующая радиация, световой режим, окислительный стресс, химические факторы, голодание и др. (Волкова и др., 2013; Горенская, Бугорская, 2008; Навроцкая, 2006). Адаптивный ответ на внешнее воздействие может осуществляться на клеточном уровне и на уровне целого организма *Drosophila melanogaster*. Изменяются такие интегральные количественные показатели, как продолжительность предимагинальной и имагинальной стадий онтогенеза, плодовитости, жизнеспособности и др. Они, в свою очередь, определяются клеточными механизмами стрессоустойчивости, такими как репарация ДНК, контроль клеточного цикла, обезвреживание свободных радикалов и ответ на тепловой шок (Москалев, 2008).

Изменение характера проявлений адаптивно важных признаков у дрозофилы после воздействия микроволн показано многими авторами, но результаты значительно различаются, в зависимости от используемого диапазона длин волн, интенсивности и длительности облучения, фазы развития дрозофилы, на которой проводили облучение, а также других условий эксперимента.

В работе (Panagoroulos, Karabarounis, 2004) показан эффект от действия электромагнитного излучения мобильного телефона на частоте 900 МГц (мухи облучались в ближней зоне телефонной антенны мобильного телефона по 6 минут в день в течение первых 2–5 дней их жизни). Показано, что электромагнитное излучение, модулированное человеческим голосом (телефон в режиме разговора), снижает репродуктивную способность дрозофилы на 50–60 %, в то время как поле, не модулируемое разговором (режим молчания телефона) снижает репродуктивную способность на 15–20 % (Panagoroulos, Karabarounis, 2004). В последующем исследовании тех же авторов показано, что прерывистое воздействие уменьшает репродуктивный потенциал, изменяет актиновый цитоскелет яйцевых камер и вызывает фрагментацию ДНК в клетках. Прерывистые воздействия с 10-минутными интервалами между сеансами облучения оказалось почти столь же эффективным, как длительное воздействие той же общей продолжительности, в то время как более длительные интервалы между экспозициями дают организму время, необходимое для восстановления, чтобы частично преодолеть указанные выше эффекты воздействия GSM (Chavdoula et al., 2010).

При исследовании влияния на плодовитость дрозофилы постоянного излучения мобильного телефона (900/1,900 МГц; SAR=1,4 Вт/кг) в течение 10 дней, от момента откладки яиц до окукливания, было показано увеличение плодовитости дрозофилы по показателю количества потомков и повышение концентрации важных регуляторных белков: hsp70 и SRE, фосфорилирование и увеличение связывания с ДНК транскрипционного фактора ELK-1 (Weisbrot et al., 2003). Интересно, что в нашей работе также было показано увеличение жизнеспособности мух линий *Canton-S*, *black* и *black_{Canton-S}*, которое определялось по показателю реальной плодовитости по сравнению с контролем у мух, развившихся из яиц, облученных микроволнами, $p < 0,01$ (частота – 37,7 ГГц, плотность потока энергии в точке размещения объекта – 10 мкВт/см² и 100 мкВт/см², время облучения – 10 секунд (Горенская и др., 2010а, б).

В наших предыдущих работах было показано снижение доли имаго, развившихся из яиц, подвергнутых облучению микроволнами с частотой 42,25 ГГц при плотности потока мощности излучения 0,2 мВт/см², в течение 10 минут, по сравнению с контролем. Негативный эффект на

плодовитість мух оказывало излучение с различной эллиптической поляризацией. При сравнении линейно поляризованного, правополяризованного и левополяризованного излучений одинаковой мощности показано, что наибольший эффект оказывало левополяризованное излучение (Shckorbatov et al., 2004). Основываясь на данных об усилении эффекта трансинактивации гена *brown^D*, авторы предположили, что наблюдаемый эффект является проявлением повышения степени конъюгации хромосом в интерфазном ядре. Напротив, действие излучения с правой круговой поляризацией связано с уменьшением эффекта трансинактивации, что, в свою очередь, связано с уменьшением степени конъюгации гомологичных хромосом в интерфазном ядре (Shckorbatov et al., 2003). Электромагнитные поля низкой интенсивности вызывали повышение частоты доминантных летальных мутаций в трех поколениях дрозофилы. Наибольшее увеличение частоты доминантных летальных мутаций наблюдали при действии линейнополяризованного электромагнитного поля (Пасюга и др., 2007).

Также изучали воздействие электромагнитного поля на размеры пуфов политенных хромосом слюнных желез дрозофилы, жизнеспособность и плодовитость дрозофил линии дикого типа *Canton-S*. Электромагнитные характеристики поля, используемого в эксперименте: частота – 36,64 ГГц, плотность мощности на поверхности облучаемого объекта – 0,4 Вт/м², время экспозиции – 10 секунд. Облучение проводили на стадии яйца. У личинок, которые развились из облученных яиц, тестируемые экдизонзависимые пуфы (71CE, 82EF и 83E) имели значительно меньшие размеры, чем в контроле. При этом жизнеспособность дрозофилы, которую оценивали по количеству взрослых мух, развившихся из облученных яиц, уменьшилась, а частота доминантных летальных мутаций увеличилась (Shakina et al., 2011).

В работе (Atli, Unlu, 2007) было исследовано влияние микроволн на плодовитость дрозофилы. Самки линии *Oregon* были подвергнуты облучению с частотой 10 ГГц в двух вариантах – непрерывному облучению в течение 3, 4 и 5 ч, а также прерывистому облучению – 3 ч экспозиции и еще 3 ч, с 30 мин интервалом в экспозиции. В группах, облучаемых в течение 4 и 5 ч, было обнаружено статистически значимое снижение средней плодовитости по сравнению с контролем. Отмечено снижение плодовитости в группах мух, облучаемых постоянно 3 часа и прерывистым облучением 3 + 3 ч, но это снижение не было статистически значимым (Atli, Unlu, 2007). Воздействие микроволн в данном режиме вызывает задержку развития дрозофилы (Atli, Unlu, 2006). Продлить срок жизни самок дрозофилы может и облучение микроволнами в разных режимах: 5 ч непрерывного облучения и в режиме 3 + 3 ч с получасовым перерывом (характеристики излучения те же, что и в предыдущих двух работах). Частота рецессивных летальных мутаций у потомков мух после облучения не отличалась от контроля (Memmi, Ünlü, 2007).

Использование в качестве источника облучения FM-радио, телевизионных станций, GSM и UMTS телефонов/базовых станций, сетей Wi-Fi, DECT телефонов, даже при очень низких уровнях интенсивности, значительно ниже рекомендуемых Международной комиссией по защите от неионизирующего излучения (МКЗНИ, ICNIRP), приводило к статистически значимому снижению плодовитости и индукции апоптоза клеток фолликулов дрозофилы (Margaritis et al., 2014; Sagioglou et al., 2016). Margaritis et al. (2014) полагают, что оогенез дрозофилы можно использовать как биомаркер при изучении биологического действия ЭМП. Таким образом, работы многих авторов демонстрируют многообразие генетических эффектов последствия низкоинтенсивного электромагнитного излучения, зачастую противоречивых, что не достаточно для понимания механизмов процесса. И особенный интерес представляют вопросы формирования адаптивного ответа организмов при кратковременном воздействии крайневысокочастотного излучения в зависимости от генотипа.

Целью данной работы было изучение влияния малых доз ЭМИ КВЧ на длительность предимагинального развития и устойчивость к голоданию *Drosophila melanogaster* в зависимости от генотипа.

Методика

В работе использовалась неселектированная линия дикого типа *Canton-S*, мутантная линия *black* (2–48.5, положение на цитологической карте 34E5–35D1) и линия с замещенным генотипом *black^{Canton-S}* (мутация *black* перенесена на генетический фон линии дикого типа *Canton-S* путем возвратных насыщающих скрещиваний *Drosophila melanogaster*) (Воробьева, Калабухова, 2001). Линии взяты из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина, которая является Национальным достоянием Украины.

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$. В качестве объекта воздействия использовали 2-часовые синхронизированные кладки яиц от четырехдневных имаго. Для получения синхронизированных кладок виргинных самок содержали в течение трех дней на стандартной среде, а затем скрещивали в течение суток с трехдневными самцами и помещали в пробирки на два часа.

Для получения электромагнитного излучения с заданными характеристиками использовали генератор высокочастотный Г4-156 и измерительные антенны типа П6-10А и П6-11А. Заданная частота ЭМ колебаний – 37,7 ГГц. В опыте 1 мощность излучения в точке размещения объекта (синхронизированные кладки яиц) составляла 10 мкВт, время воздействия 1 минута. Характеристика внешнего воздействия в опыте 2 – 10 мкВт, экспозиция 5 минут и в опыте 3 – 100 мкВт, экспозиция 1 минута. Мощность излучения, подводимая к объекту, измерялась ваттметром М1-25 (Илларионов, 1998).

Длительность предимагинального развития учитывали в часах от момента начала яйцекладки до выхода имаго. В качестве контроля использовали синхронизированные кладки, полученные от мух линий *C-S*, *b*, *b_{C-S}*, которые развивались на стандартной среде, без внешнего воздействия.

Продолжительность жизни мух при голодании определяли, помещая их в пробирки без корма, отдельно самок и самцов. В условиях голодания мухи контактировали с влажной средой. Учет выживших мух проводили отдельно для самок и самцов каждые два часа до полной гибели всех особей.

Рассчитывалась ошибка среднего значения по методу стандартного отклонения. Достоверность различий, контрольной и опытной группы оценивалась при помощи *t*-критерия Стьюдента для нормального распределения. Оценку достоверности и силы влияния внешнего и генетического фактора на изучаемые показатели проводили при помощи двухфакторного дисперсионного анализа (по методу Снедекора) (Лакин, 1990).

Результаты и обсуждение

Одной из компонент адаптивной ценности у дрозофилы является скорость предимагинального онтогенеза. Этот показатель обусловлен генетическими факторами у особей с определенным генотипом при определенных условиях среды. Среди таких факторов следует отметить гены, а также локусы количественных признаков, представляющие собой полиморфные гены. Изменения в длительности предимагинального развития при действии малых доз КВЧ облучения в зависимости от генотипа показаны на рис. 1.

Длительность предимагинального развития возрастает в опыте 1 от 4,7 до 9,5 ч и в опыте 2 на 12,65 ч и 3,45 ч (линии *C-S* и *b_{C-S}* соответственно) по сравнению с контролем. Эти данные хорошо согласуются с данными работы (Atli, Unlu, 2006), хотя в указанной работе облучению подвергались не яйца, а личинки мух. Увеличение дозы действующего фактора до 100 мкВт (опыт 3) приводит к сокращению продолжительности развития до стадии куколки в среднем на 44,5 ч. Наиболее чувствительной оказалась линия *black*, где изучаемый показатель снизился на 51 час. Двухфакторный дисперсионный анализ показал зависимость длительности предимагинального развития как от генотипа, $F_{\text{♀}}=18,10$, $F_{\text{♂}}=7,82$, и от длительности воздействия изучаемого физического фактора, $F_{\text{♀}}=78,05$, $F_{\text{♂}}=39,53$, так и от сочетанного действия обоих факторов, $F_{\text{♀}}=9,62$, $F_{\text{♂}}=5,37$ (для самок и самцов соответственно). При этом сила влияния генотипа составила 2,45% и 3,27%, внешнего воздействия – 13,86% и 18,48%, сочетанного действия обоих изучаемых факторов – 4,72% и 6,29% (для самок и самцов соответственно).

Поскольку наиболее контрастные результаты в длительности предимагинального развития оказались в опытах 1 и 3, продолжительность жизни при голодании была изучена у линий дрозофилы при этих характеристиках внешнего воздействия. Результаты работы по изучению показателя продолжительности жизни при голодании при действии малых доз КВЧ излучения у дрозофилы в зависимости от генотипа показаны на рис. 2.

Наиболее чувствительными к действию внешнего фактора оказались самцы мутантной линии и линии с замещенным генотипом. Двухфакторный дисперсионный анализ показал зависимость продолжительности жизни при голодании как от генотипа, $F_{\text{♀}}=131,06$, $F_{\text{♂}}=83,64$ и от длительности воздействия изучаемого физического фактора, $F_{\text{♀}}=15,16$, $F_{\text{♂}}=6,03$, так и от сочетанного действия обоих факторов, $F_{\text{♀}}=3,77$, $F_{\text{♂}}=3,06$. При этом сила влияния генотипа составила 43,42% и 59,52%,

действия ЭМИ – 4,70% и 3,62%, сочетанного действия обоих изучаемых факторов – 3,68% и 4,46% (для самок и самцов соответственно).

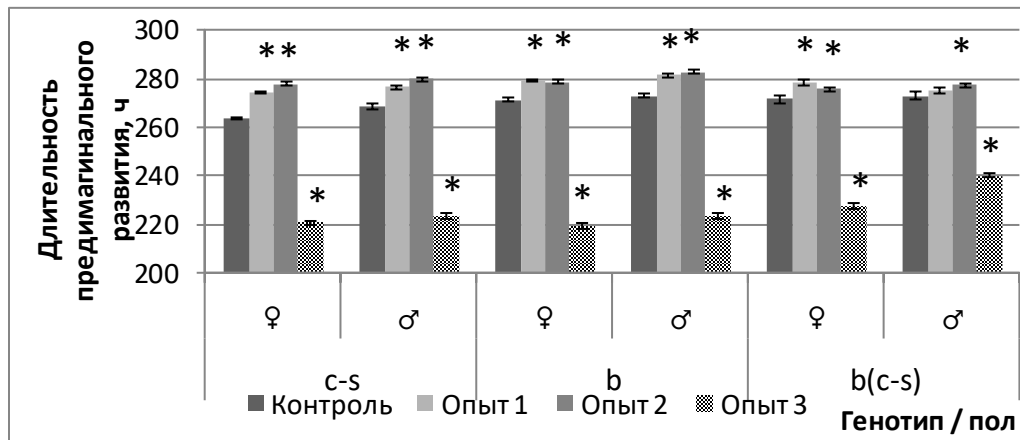


Рис. 1. Изменение длительности предимагинального развития у дрозофилы при воздействии малых доз КВЧ излучения

* Достоверность отличий от контроля $p < 0,05$.

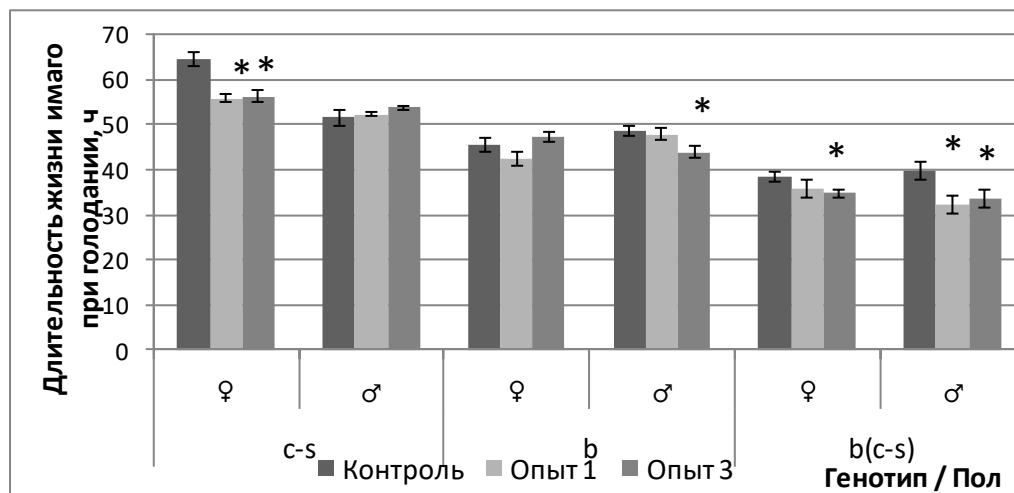


Рис. 2. Изменение продолжительности жизни при голодании при действии малых доз КВЧ излучения у дрозофилы в зависимости от генотипа

* Достоверность отличий от контроля $p < 0,05$.

Механизм действия микроволнового излучения связан, в частности, с изменением структуры хроматина, а именно с повышением уровня гетерохроматинизации (Shckorbatov et al., 2009).

Ранее нами показано, что длительность предимагинального развития дрозофилы может регулироваться кратковременными воздействиями КВЧ и зависит от стадии развития особи, на которой прошло воздействие, и от генотипа (Горенская и др., 2010b). Действие ЭМП КВЧ с частотой 37,7 ГГц приводит к увеличению реальной плодовитости у линий *Canton-S* и *black* по сравнению с контролем. Жизнеспособность возрастает у имаго линии с замещенным генотипом *blackCanton-S* (Горенская и др., 2010b). Таким образом, нашими исследованиями показано, что кратковременное (на протяжении одной минуты) действие ЭМИ КВЧ с частотой 37,7 ГГц на стадии яйца увеличивает длительность предимагинального развития дрозофилы, приводит к возрастанию количества потомков от одной пары особей и снижению устойчивости имаго к голоданию. При этом доля особей, погибших

на стадии куколки, достоверно не отличалась от уровня контроля во всех вариантах эксперимента (табл. 1).

Таблица 1.
Доля особей, погибших на стадии куколки у дрозофилы при действии ЭМИ КВЧ, %

Вариант эксперимента	Генотип		
	<i>Canton-S</i>	<i>black</i>	<i>black_{Canton-S}</i>
Контроль	9,3 ± 2,1	5,4 ± 1,1	18,0 ± 3,7
Опыт 1	8,9 ± 1,4	5,7 ± 1,1	13,4 ± 2,1
Опыт 3	10,6 ± 1,8	5,6 ± 0,9	10,7 ± 2,6

Чрезмерное снижение потребления пищи (голодание) укорачивает жизнь в первую очередь за счет окислительного стресса и дефектов репарации ДНК, однако присутствие в геноме дрозофил дополнительных активных копий генов репарации ухудшает стрессоустойчивость особей к голоданию (Шилова и др., 2014). Умеренное ограничение диеты, напротив, увеличивает продолжительность жизни у многих видов организмов (Partridge et al., 2005). По-видимому, нервная система животных, воспринимая извне сигнал о недостатке пищи, запускает адаптационную программу стресс-ответа, приводящую к повышению экономичности метаболизма и стрессоустойчивости, что обуславливает долгожительство (Москалев, 2008) и сокращает расходы энергии на репродукцию (Новосельцев, Новосельцева, 2011; Partridge et al., 2005).

В нашей работе показан половой диморфизм по признаку продолжительности жизни при голодании у линии дикого типа. Это явление было ранее обнаружено у разных видов мух рода *Drosophila* (Service et al., 1985). В условиях голодания выживаемость имаго *Drosophila* зависит от количества углеводов и жиров в составе их тканей (Москалев, 2008). При этом самцы способны использовать имеющиеся энергетические запасы более эффективно, чем самки, так как отношение длительности жизни при голодании (часы) к массе липидов в тканях тела (мг) у них выше, чем у самок.

При мутации *black* в организме дрозофилы не синтезируется бета-аланин, хотя его усвоение возможно. Действие карнозина (бета-аланил-L-гистидина) и его аналогов увеличивает длительность жизни самцов *Drosophila melanogaster* (Stvolinsky et al., 2010). Авторы предполагают, что наблюдаемый эффект карнозина отражает его защитное действие на организм в условиях накопления с возрастом свободнорадикальных соединений. В наших экспериментах линии, несущие мутацию *black*, характеризовались пониженной устойчивостью к голоданию и в контроле, и при действии ЭМИ, что, возможно, связано со сниженным уровнем бета-аланина.

Длительность личиночного развития насекомых зависит от баланса в гемолимфе основных гормонов развития, которые являются одновременно и важнейшими звеньями эволюционно консервативного механизма стресс-реакции (Раушенбах и др., 2005). Биогенные амины (дофамин, октопамин), ювенильный гормон и экдистероиды контролируют центральное звено неспецифической адаптивной гормональной реакции, аналогичной стрессу у млекопитающих. У имаго устойчивость к голоданию, как один из компонентов механизма выживания, в значительной степени контролируется инсулиновой системой регуляции (Москалев, 2008). Потребление мухами дрожжей вызывает выработку инсулиноподобных пептидов нейросекреторными клетками мозга, а эти пептиды необходимы для синтеза вторичных гормонов (ювенильного и экдистероидов). Эти гормоны, наряду с дофамином и октопамином, контролируя энергетический метаболизм насекомых, играют роль в адаптации индивидуумов к неблагоприятным условиям (Москалев, 2008). Взрослые мухи, питающиеся только водой, вырабатывают меньше экдистероидов. У *Drosophila melanogaster* стимулирующей гормональный синтез пищей являются дрожжи.

Действительно, потребление дрожжей именно взрослыми мухами (не личинками) стимулирует синтез ювенильного гормона. Взрослые мухи, питающиеся только сахаром и водой, вырабатывают меньше экдистероидов, а потребление дрожжей самками, перенесшими голодание в течение суток, приводит к усилению выработки экдистероидов их яйчниками (Tu et al., 2006).

Удаление медианных нейросекреторных клеток в мозгу дрозофилы, синтезирующих инсулиноподобные пептиды, приводит к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни и устойчивости к оксидативному стрессу и голоданию. Одновременно наблюдается повышение

голодного уровня глюкозы в гемолимфе взрослых животных, наподобие того, как это происходит при диабете у млекопитающих. Такие животные характеризуются повышенным накоплением липидов и углеводов, сниженной плодовитостью и пониженной переносимостью жары и холода (Broughton et al., 2005). В наших экспериментах кратковременное воздействие ЭМИ КВЧ снижает устойчивость к голоданию и, как показано ранее, увеличивает плодовитость и жизнеспособность особей. Можно предположить, что внешнее воздействие нарушает выработку инсулиноподобных пептидов, что влечет за собой нарушение баланса вторичных гормонов, и, как следствие, адаптация организмов к голоданию не столь успешна, как в контроле. Кроме того, как следует из полученных нами результатов, процесс адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды затруднен при отсутствии в организме бета-аланина.

Полученные в работе результаты могут быть объяснены и изменением в активности гена *p53* под влиянием малых доз крайневисокочастотного излучения. Этот белок у дрозофилы контролирует в основном стресс-индуцированный апоптоз, и снижение его активности может продлевать жизнь путем снижения апоптоза незамещаемых постмитотических клеток (Bauer et al., 2005). Предположительно, *p53* является компонентом механизма влияния ограничения калорийности на долгожительство (Bauer et al., 2005). У личинок дрозофилы, подвергшиеся радиации, экспрессия доминантно-негативных, не способных связываться с ДНК вариантов *p53* в нейронах взрослых особей дрозофил приводит к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни, но устойчивость к голоданию у таких мух не отличалась от контроля (Москалев, 2008). Одним из ответов на пищевой стресс (голодание) является ухудшение биогенеза рибосом нейросекреторных клеток, синтезирующих инсулиноподобные пептиды. Этот процесс контролируется *p53* и киназой *ERK7*, и приводит, в частности, к увеличению длительности личиночной стадии (Nasygar, Nietakangas, 2014).

Как показано, многочисленные биологические эффекты, связанные с воздействиями ЭМИ на живые организмы, наблюдается вблизи частоты 40 ГГц, что совпадает с резонансной частотой третичной структуры ДНК-спирали (Сапрыка и др., 2014). Предполагается, что поскольку ДНК прикрепляются к мембранам, последние могут служить антеннами, с помощью которых осуществляется возбуждение колебаний в ДНК. Наблюдаемые эффективные частоты совпадают с предсказанными резонансными частотами колебаний клеточных мембран (Бецкий и др., 1988). Вопрос о генетическом значении ядерных потенциалов обсуждался и ранее. В.Г.Шахбазов в своей гипотезе ядрона – ядерного генератора генетических и метаболических функций клетки – изложил представления о своеобразной объемной поляризации нативных структур ДНК и о их функционировании как микроскопических осцилляторов, порождающих электромагнитные и акустические волны в клетке (Шахбазов, 1966).

Выводы

Результаты работы показали, что воздействие кратковременного микроволнового излучения с частотой 37,7 ГГц на стадии яйца у дрозофилы при поверхностной плотности мощности излучения 10 мкВт увеличивает длительность предимагинального развития и снижает устойчивость имаго к голоданию. При воздействии КВЧ излучения при поверхностной плотности мощности излучения 100 мкВт уменьшается длительность предимагинального развития и снижается устойчивость имаго к голоданию. При этом процент особей, погибших на стадии куколки, достоверно не отличался от уровня контроля во всех вариантах эксперимента. Скорость предимагинального развития зависит в большей степени от внешнего воздействия. Основным фактором, определяющим длительность жизни при голодании после действия ЭМИ КВЧ, является генотип.

Список литературы

- Бецкий О.В., Голант М.Б., Девятков Н.Д. Миллиметровые волны в биологии. – М.: Знание, 1988. – 64с. /Betskiy O.V., Golant M.B., Devyatkov N.D. Millimetrovyye volny v biologii. – M.: Znaniye, 1988. – 64s./
- Волкова Н.Е., Филипоненко Н.С., Красовская В.В. и др. Влияние фолиевой кислоты и метионина на приспособленность *Drosophila melanogaster* // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2013. – Вип.17, №1056. – С. 69–83. /Volkova N.Ye., Filiponenko N.S., Krasovskaya V.V. i dr. Vliyanie foliyevoy kisloty i metionina na prispособlennost' *Drosophila melanogaster* // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2013. – Vyp.17, №1056. – S. 69–83./
- Воробьева Л.И., Калабухова Н.Н. Изучение взаимосвязи содержания меланина с адаптивными свойствами некоторых мутантных линий дрозофилы // Биологический вестник. – 2001. – № 1–2. – С. 139–142. /Vorob'yeva L.I., Kalabukhova N.N. Izucheniye vzaimosvyazi soderzhaniya melanina s adaptivnymi svoystvami nekotorykh mutantnykh liniy drozofily // Biologicheskiy vestnik. – 2001. – № 1–2. – S. 139–142./

- Горенская О.В., Бугорская Н.В. Влияние кофеина на некоторые адаптивно важные признаки у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2008. – Вип.8 (828). – С. 30–34. /Gorenskaya O.V., Bugorskaya N.V. Vliyaniye kofeina na nekotoryye adaptivno vazhnyye priznaki u *Drosophila melanogaster* Meig. // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2008. – Vyp.8 (828). – S. 30–34./
- Горенская О.В., Гаврилов А.Б., Шкорбатов Ю.Г. и др. Влияние генотипа на приспособленность дрозофилы при воздействии малых доз сверхвысокочастотного электромагнитного излучения // Вісник проблем біології і медицини. – 2010а. – Вип.1. – С. 52–56. /Gorenskaya O.V., Gavrilov A.B., Shkorbatov Yu.G. i dr. Vliyaniye genotipa na prispособlennost' drozofily pri vozdeystvii malykh doz sverkhvysokochastotnogo elektromagnitnogo izlucheniya // Visnyk problem biologiyi i medytsyny. – 2010a. – Vyp.1. – S. 52–56./
- Горенская О.В., Повар М.В., Гаврилов А.Б. Анализ показателя длительности предимагинального развития у дрозофилы при воздействии малых доз сверхвысокочастотного электромагнитного излучения // VI Межд. науч. конф. «Факторы экспериментальной эволюции организмов». Зб. наук. праць. – 2010b. – Т.8. – С. 112–116. /Gorenskaya O.V., Povar M.V., Gavrilov A.B. Analiz pokazatelya dlitel'nosti predimaginal'nogo razvitiya u drozofily pri vozdeystvii malykh doz sverkhvysokochastotnogo elektromagnitnogo izlucheniya // VI Mezhd. nauch. konf. «Fakty eksperymental'noy evolyutsiyi organizmiv». Zb. Nauk. prats'. – 2010b. – T.8. – S. 112–116./
- Илларионов В.Е. Медицинские информационно-волновые технологии. – М.: ВЦ МК «Защита», 1998. – 52с. /Illarionov V.Ye. Meditsinskiye informatsionno-volnovyye tekhnologii. – M.: VTs MK «Zashchita», 1998. – 52s./
- Коршунов В.А., Воронов В.Л., Голуб Д.Н. Метод уменьшения погрешности измерений мощности СВЧ путем электрической подстройки КСВН измерительного преобразователя с помощью изменения сопротивления рабочего термистора // Информационно-измерительные и управляющие системы. – 2004. – №4. – С. 30–32. /Korshunov V.A., Voronov V.L., Golub D.N. Metod umen'sheniya pogreshnosti izmereniy moshchnosti SVCh putem elektricheskoy podstroyki KSVN izmeritel'nogo preobrazovatelya s pomoshch'yu izmeneniya soprotivleniya rabochego termistora // Informatsionno-izmeritel'nyye i upravlyayushchiye sistemy. – 2004. – №4. – S. 30–32./
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с. /Lakin G.F. Biometriya. – M.: Vysshaya shkola, 1990. – 352s./
- Москалев А.А. Старение и гены. – СПб.: Наука, 2008. – 358с. /Moskalev A.A. Starenie i geny. – SPb.: Nauka, 2008. – 358s./
- Навроцкая В.В. Проявление количественных признаков *Drosophila melanogaster* в зависимости от воздействия света на разные стадии гаметогенеза особей родительского поколения // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип.3, №729. – С. 113–119. /Navrotskaya V.V. Proyavleniye kolichestvennykh priznakov *Drosophila melanogaster* v zavisimosti ot vozdeystviya sveta na raznyye stadii gametogeneza osobey roditel'skogo pokoleniya // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2006. – Vyp.3, №729. – S. 113–119./
- Новосельцев В.Н., Новосельцева Ж.А. Ограничение питания и продолжительность жизни: управление и моделирование // Проблемы управления. – 2011. – №2. – С. 60–69. /Novosel'tsev V.N., Novosel'tseva Zh.A. Ogranicheniye pitaniya i prodolzhitel'nost' zhizni: upravleniye i modelirovaniye // Problemy upravleniya. – 2011. – №2. – S. 60–69./
- Пасюга В.Н., Грабина В.А., Быков В.Н. и др. Долговременные эффекты низкоинтенсивных электромагнитных полей на частоту мутаций у дрозофилы // 17th International Crimean Conference – Microwave & Telecommunication Technology. – 2007. – P. 783–784. /Pasyuga V.N., Grabina V.A., Bykov V.N. i dr. Dolgovremennyye efekty nizkointensivnykh elektromagnitnykh poley na chastotu mutatsiy u drozofily // 17th International Crimean Conference – Microwave & Telecommunication Technology. – 2007. – P. 783–784./
- Раушенбах И.Ю., Груntenко Н.Е., Карпова Е.К. 20-гидроксиэкидизон взаимодействует с ювенильным гормоном и дофамином в контроле плодовитости *Drosophila virilis* // ДАН. – 2005. – Т.400. – С. 847–849. /Raushebakh I.Yu., Gruntenko N.Ye., Karpova Ye.K. 20-gidroksiekdizon vzaimodeystvuyet s yuvenil'nym gormonom i dofaminom v kontrole plodovitosti *Drosophila virilis* // DAN. – 2005. – T.400. – S. 847–849./
- Рытенкова О. Развитие новых трендов в области фиксированной спутниковой связи // Технологии и средства связи. – 2015. – №3. – С. 56–62. /Rytenkova O. Razvitiye novykh trendov v oblasti fiksirovannoy sputnikovoy svyazi // Tekhnologii i sredstva svyazi. – 2015. – №3. – S. 56–62./
- Сапрыка А.В., Артюшенко А.В., Ляшенко Г.А. Методы выбора частоты КВЧ-облучения животных для микроволновой терапии // Вісник Харківського національного технічного університету сільського господарства імені Петра Василенка. – 2014. – Вип.153. – С. 173–174. /Sapryka A.V., Artyushenko A.V., Lyashenko G.A. Metody vybora chastoty KVCh-oblucheniya zhivotnykh dlya mikrovolnovoy terapii // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo tekhnichnogo universytetu sil's'kogo gospodarstva imeni Petra Vasylenka. – 2014. – Vyp.153. – S. 173–174./
- Шахбазов В.Г. Новая генетична гіпотеза на основі біофізичних дослідів // Організм як система. – К., 1966. – С. 98–106. /Shakhbazov V.G. Nova genetychna gipoteza na osnovi biofizychnykh doslidiv // Organizm yak systema. – K., 1966. – S. 98–106./
- Шилова Л.А., Плюснина Е.Н., Москалев А.А. Влияние кондиционной повсеместной сверхэкспрессии генов репарации ДНК на устойчивость особей *Drosophila melanogaster* к действию стресс-факторов различной природы (оксидативному стрессу, тепловому шоку, голоданию) // Известия Коми научного центра УРО РАН. – 2014. – №2 (18). – С. 41–45. /Shilova L.A., Plyusnina Ye.N., Moskalev A.A. Vliyaniye konditsionnoy

- povsemestnoy sverkhexpressii genov reparatsii DNK na ustoychivost' osobey *Drosophila melanogaster* k deystviyu stress-faktorov razlichnoy prirody (oksidativnomu stressu, teplovomu shoku, golodaniyu) // Izvestiya Komi nauchnogo tsentra URO RAN. – 2014. – №2 (18). – S. 41–45./
- Шкорбатов Ю.Г., Шахбазов В.Г. Влияние микроволнового облучения на биологические объекты // Радиопизика и электроника. – 2000. – Т.5, №1. – С. 179–185. /Shkorbatov Yu.G., Shakhbazov V.G. Vliyaniye mikrovolnovogo oblucheniya na biologicheskiye ob'yekty // Radiofizika i elektronika. – 2000. – Т.5, №1. – S. 179–185./
- Atli E., Unlu H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the development of *Drosophila melanogaster* // Int. J. Radiat. Biol. – 2006. – Vol.82, №6. – P. 435–441.
- Atli E., Unlu H. The effects of microwave frequency electromagnetic fields on the fecundity of *Drosophila melanogaster* // Turk. J. Biol. – 2007. – Vol.31. – P. 1–5.
- Bauer J.H., Poon P.C., Glatt-Deeley H. et al. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span // Current Biol. – 2005. – Vol.15. – P. 2063–2068.
- Broughton S.J., Piper M.D.W., Ikeya T. et al. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol.102, №8. – P. 3105–3110.
- Chavdoula E.D., Panagopoulos D.J., Margaritis L.H. Comparison of biological effects between continuous and intermittent exposure to GSM-900-MHz mobile phone radiation: Detection of apoptotic cell-death features // Mutation Research. – 2010. – Vol.700. – P. 51–61.
- Hasygar K., Hietakangas V. p53- and ERK7-dependent ribosome surveillance response regulates *Drosophila* insulin-like peptide secretion // PLOS Genetics. – 2014. – Vol.10, №11. – P. 1–12.
- Margaritis L.H., Manta A.K., Kokkaliaris K.D. et al. *Drosophila* oogenesis as a bio-marker responding to EMF sources // Electromagn. Biol. Med. – 2014. – Vol.33, №3. – P. 165–189.
- Memmi B.K., Ünlü H. The effects of short duration microwave exposure on the life span and the induction of sex-linked recessive lethal mutations in *Drosophila melanogaster* // Hacettepe J. Biol. & Chem. – 2007. – Vol.35, №3. – P. 173–179.
- Panagopoulos D. J., Karabarbounis A. Effect of GSM 900-MHz mobile phone radiation on the reproductive capacity of *Drosophila melanogaster* // Electromagnetic biology and medicine. – 2004. – Vol.23, №1. – P. 29–43.
- Partridge L., Gems D., Withers D.J. Sex and death: what is the connection? // Cell. – 2005. – Vol.120. – P. 461–472.
- Sagioglou N.E., Manta A.K., Giannarakis I.K. et al. Apoptotic cell death during *Drosophila* oogenesis is differentially increased by electromagnetic radiation depending on modulation, intensity and duration of exposure // Electromagn. Biol. Med. – 2016. – Vol.35, №1. – P. 40–53.
- Service P.M., Hutchinson E.W., Mackinely M.D. et al. Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence // Physiol. Zool. – 1985. – Vol.58, №4. – P. 380–389.
- Shakina L.A., Pasiuga V.N., Dumin O.M. et al. Effects of microwaves on the puffing pattern of *D. melanogaster* // Central European Journal of Biology. – 2011. – Vol.6, №4. – P. 524–530.
- Shkorbatov Y. G., Evsseva M. V., Shakhbazov V. G. et al. Influence of the microwave radiation of different polarization state on transinactivation effect and viability of *Drosophila* // IV International Conference on Antenna Theory and Techniques. – Sevastopol, 2003. – Vol.2. – P. 823–824.
- Shkorbatov Y., Pasiuga V., Kolchigin N. et al. Changes in the human nuclear chromatin induced by ultra wideband pulse irradiation // Central European Journal of Biology. – 2009. – Vol.4, №1. – P. 97–106.
- Shkorbatov Y.G., Trofimov S.V., Shakhbazov V.G. et al. The influence of microwaves with different state of polarization upon the state of chromatin and viability of *Drosophila* // The Second International workshop UWBUSIS'04. – 2004. – P. 246–247.
- Stvolinsky S., Antipin M., Meguro K. et al. Effect of carnosine and its Trolox-modified derivatives on life span of *Drosophila melanogaster* // Rejuvenation Res. – 2010. – Vol.13, №4. – P. 453–457.
- Tu M-P., Flatt T., Tatar M. Juvenile and steroid hormones in *Drosophila melanogaster* longevity // Handbook of the biology of aging. – Amsterdam: Acad. Press, 2006. – P. 407–440.
- Weisbrot D., Lin H., Ye L. et al. Effects of mobile phone radiation on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* // Journal of Cellular Biochemistry. – 2003, №89. – P. 48–55.

Представлено: Т.О.Слецька / Presented by: T.O.Yeletska

Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 30.03.2016

УДК: 57.017.3:57.017.67:575.167

Влияние возраста родителей и аллельного состояния гена *white* на показатели приспособленности *Drosophila melanogaster*

Н.В.Колот¹, В.В.Костенко², Л.И.Воробьева¹

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
natakolot@mail.ru

²Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (Казань, Российская Федерация)
kostenkoviktoria88@rambler.ru

В линиях *Drosophila melanogaster* дикого типа и мутантных, различающихся аллелями локуса *white*, изучены показатели приспособленности (яйцепродукция, уровень доминантных летальных мутаций, плодовитость, жизнеспособность) потомков первого поколения 3-, 10- и 20-суточных родителей. Показано, что с увеличением возраста родителей у потомков первого поколения всех изученных линий снижаются показатели яйцепродукции, плодовитости, жизнеспособности и увеличивается процент доминантных летальных мутаций, особенно на ранних стадиях эмбриогенеза. Установлено, что формирование изучаемых компонентов приспособленности потомков зависит не только от возраста родителей, но и от генетического фона и аллельного состояния гена *white*.

Ключевые слова: возраст родителей, приспособленность, генетический фон, аллели гена *white*, *Drosophila melanogaster*.

Вплив віку батьків і алельного стану гена *white* на показники пристосованості *Drosophila melanogaster*

Н.В.Колот, В.В.Костенко, Л.И.Воробйова

У ліній *Drosophila melanogaster* дикого типу та мутантних, що розрізняються алелями локусу *white*, вивчені показники пристосованості (яйцепродукція, рівень домінантних летальних мутацій, плодючість, життєздатність) нащадків першого покоління 3-, 10- та 20-добових батьків. Показано, що зі збільшенням віку батьків у нащадків першого покоління всіх вивчених ліній знижуються показники яйцепродукції, плодючості, життєздатності та збільшується відсоток домінантних летальних мутацій, особливо на ранніх стадіях ембріогенезу. Встановлено, що формування досліджуваних компонентів пристосованості нащадків залежить не тільки від віку батьків, а й від генетичного фону та алельного стану гена *white*.

Ключові слова: вік батьків, пристосованість, генетичний фон, алелі гена *white*, *Drosophila melanogaster*.

The influence of parental age and allelic status of gene *white* on *Drosophila melanogaster* fitness

N.V.Kolot, V.V.Kostenko, L.I.Vorobyova

We have analyzed fitness components (eggs production, level of dominant lethal mutations, fertility, and viability) in the first generation offspring of 3-, 10- and 20-days parents in *Drosophila melanogaster* wild-type and mutant stocks with different alleles of the locus *white*. It has been shown that with the increase of parental age in the first generation offspring of all the studied stocks eggs production, fertility, viability decrease and percentage of dominant lethal mutations increase, especially in the early stages of embryogenesis. Formation of studied fitness components of the offspring depends not only on the age of parents, but also on the genetic background and allelic status of the *white* gene.

Key words: parental age, fitness, genetic background, alleles of the *white* gene, *Drosophila melanogaster*.

Введение

Известно, что в ходе старения у всех без исключения эукариот происходит изменение экспрессии генов (Анисимов, 2000), структурно-функциональных свойств генетического материала (Rattan, 1998), физиологических показателей, внутриклеточного метаболизма и репродуктивной способности. Возрастные изменения связаны с увеличением числа мутаций в различных генетических локусах, с эпигенетическими изменениями ДНК и модификациями гистонов, с

нарушением сегрегации хромосом, дисфункцией основных компонентов протеолитических систем, внутриклеточным накоплением повреждённых белков и инактивацией репаративных механизмов (Kenyon, 2010). Вследствие таких изменений появляются возраст-зависимые патологии, существенно снижается продолжительность жизни и адаптационные возможности многоклеточных организмов (Eleftherianos, Castillo, 2012). Кроме того, в ряде работ (Фролькис, 1992; Kenyon, 2010; Rattan et al., 1992) старение и снижение адаптационного потенциала организма рассматриваются как неспецифические интегральные процессы, которые реализуются не только из-за изменения экспрессии определённых генов в онтогенезе, но и вследствие накопления эпигенетической «памяти» при непрерывной адаптации к эндо- и экзогенным факторам. Известно также, что мутации в некоторых генах (например, *age-1* и *clk-1* у *Caenorhabditis elegans*; *sir-2* у *Saccharomyces cerevisiae*; *Tor*, *mth* и *Indy* у *Drosophila melanogaster*; *klotho* у *Mus musculus*) обеспечивают эволюционно тонкую «настройку» генной экспрессии, регулирующей ход онтогенеза, метаболизм, формирование адаптивного ответа на изменение факторов среды, стресс-резистентность и продолжительность жизни организма (Ackermann et al., 2007; Christensen et al., 2006; Paaby, Schmidt, 2009; Takahashi et al., 2000).

Сегодня актуальным является изучение влияния возрастных изменений в организме родителей на адаптационный потенциал потомков, в частности на такие показатели, как яйцепродукция, уровень доминантных летальных мутаций в эмбриогенезе, плодовитость и жизнеспособность. В связи с этим целью данного исследования стал сравнительный анализ показателей приспособленности потомков первого поколения (F_1) 3-, 10- и 20-суточных родителей *Drosophila melanogaster* линий дикого типа и мутантных, различающихся аллелями локуса *white* и по общему генетическому фону.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования были линии дикого типа *Canton-S* (*C-S*) и *Oregon-R* (*Or*) из коллекции кафедры генетики и цитологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина и мутантные линии, различающиеся аллелями локуса *white*: *w*, *w^f*, *w^a*, *w^{sat}*. Для изучения роли данных аллелей локуса *white* в формировании признаков приспособленности предварительно были проведены насыщающие скрещивания в условиях направленного отбора на маркерную мутацию. С этой целью, для каждой исходной мутантной линии проводили 6 циклов насыщающих скрещиваний с линиями дикого типа *C-S* и *Or* (далее по тексту *M_{C-S}* – линия, в которой мутация переведена на генетический фон дикого типа *C-S*; *M_{Or}* – линия, в которой мутация переведена на генетический фон дикого типа *Or*). В результате были получены выравненные по генотипу линии (*w_{C-S}*; *w^f_{C-S}*; *w^a_{C-S}*; *w^{sat}_{C-S}*; *w_{Or}*; *w^f_{Or}*; *w^a_{Or}*; *w^{sat}_{Or}*), что позволило корректно оценивать вклад аллелей данного локуса в проявление адаптивно важных признаков приспособленности (Никоро, Васильева, 1978).

Культивирование дрозофилы проводили в стаканчиках (высота 10,0 см, диаметр 2,0 см, объём питательной среды в каждом стаканчике 5 мл), на стандартной сахарно-дрожжевой среде в воздушном термостате при температуре $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$. В эксперимент брали только виргинных особей. Для наркотизации использовали диэтиловый эфир.

Для определения влияния возраста родителей на адаптивно важные признаки приспособленности вышеуказанных линий самок и самцов дикого типа и мутантных линий содержали отдельно на питательной среде до достижения 3- (n=300), 10- (n=300) и 20-суточного (n=300) возраста. Потомки родителей 3-суточного возраста служили контрольной группой.

Показатель яйцепродукции определяли по стандартной методике, подробно описанной в работах (Волкова и др., 2005; Костенко та ін., 2014). Уровень ранних и поздних доминантных летальных мутаций (рДЛМ и пДЛМ) в эмбриогенезе определяли по стандартной методике (Тихомирова, 1990). Плодовитость (среднее количество особей, доживших до стадии куколки, в потомстве одной родительской пары) определяли по числу пупариев (Воробьёва и др., 2012). Жизнеспособность определяли по количеству имаго, полученных от пары родительских особей (Воробьёва и др., 2012). Эксперименты проводили в 3-х повторностях.

Полученные в ходе эксперимента данные были проанализированы статистически. Для оценки влияния особенностей генотипа и возраста родителей на исследуемые показатели приспособленности использовали дисперсионный анализ. Для оценки корреляционных связей между степенью пигментации глаз имаго – потомков и признаками приспособленности применяли коэффициент корреляции рангов К.Спирмена (Лакин, 1990). Достоверность различий оценивали с

помощью критерия Стьюдента (Рокицкий, 1973). Для проведения расчётов использовали программу STATISTICA 8.0.®

Результаты

Средние значения изученных показателей приспособленности потомков (F₁) 3-, 10- и 20-суточных имаго *D. melanogaster* линий дикого типа и мутантных линий, которые отличаются степенью пигментации глаз ($w < w^t < w^a < w^{sat}$), представлены в табл. 1.

Анализ яйцепродукции не показал достоверно значимых различий у 3-суточных особей линий дикого типа *C-S* и *Or*, в отличие от мутантных линий. Установлено, что средние значения яйцепродукции 3-суточных родителей всех мутантных линий, переведенных на генетический фон *C-S*, превышали значения данного показателя у родителей мутантных линий, переведенных на генетический фон *Or*, того же возраста. При этом максимальные значения данного показателя были получены для родителей 3-суточного возраста мутантных линий w^t_{C-S} и w^a_{C-S} , а минимальные – линий w_{Or} и w^{sat}_{Or} (табл. 1).

Таблица 1.
Показатели приспособленности потомков (F₁) *D. melanogaster* от родителей разного возраста линий дикого типа и мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white*

Показатели	Линии <i>D. melanogaster</i>									
	Потомки от 3-суточных родителей									
	<i>C-S</i>	<i>Or</i>	w_{C-S}	w_{Or}	w^t_{C-S}	w^t_{Or}	w^a_{C-S}	w^a_{Or}	w^{sat}_{C-S}	w^{sat}_{Or}
яйцепродукция	77,4± 9,7	82,6± 19,5	94,8± 4,9	47,4± 5,3	140,2± 4,4	109,4± 6,5	116,4± 4,1	105,4± 2,7	63,8± 7,4	44,4± 3,5
% рДЛМ	14,8± 5,9	14,9± 2,5	16,5± 2,9	7,1± 0,9	31,8± 3,8	5,2± 0,7	16,7± 2,6	6,7± 3,1	16,5± 2,5	9,9± 3,0
% пДЛМ	0,3± 0,3	4,6± 1,8	3,23± 0,4	0	0,6± 0,1	0,6± 0,4	2,6± 0,2	2,9± 0,3	0,2± 0,2	7,2± 1,9
плодовитость	40,5± 1,2	49,9± 1,5	36,4± 1,9	43,5± 1,7	25,7± 0,7	33,2± 1,9	34,9± 1,4	47,8± 1,9	44,1± 2,3	32,0± 2,0
жизнеспособность	35,8± 0,5	43,2± 0,8	28,3± 1,2	35,2± 0,7	22,2± 1,4	26,3± 0,7	26,2± 0,6	37,2± 0,8	32,6± 1,0	25,7± 0,7
	Потомки от 10-суточных родителей									
яйцепродукция	53,8± 4,0*	47± 11,0*	32,4± 3,8*	60,2± 13,8	43,6± 5,8*	122,2± 10,7	121,4± 14,4	200,4± 43,4*	43,4± 5,6*	32,4± 9,7
% рДЛМ	27,2± 1,5	37,0± 7,5*	9,1± 3,4*	34,5± 8,2*	31,9± 5,7	34,8± 1,7*	49,9± 0,8*	24,2± 5,6*	22,9± 4,8	61,2± 7,5*
% пДЛМ	4,6± 1,7*	8,7± 2,7	6,1± 1,4*	4,2± 0,5*	9,6± 1,5*	6,6± 0,5*	4,2± 0,3*	5,2± 0,9	4,7± 1,7*	1,3± 0,8*
плодовитость	53,8± 4,8*	39,7± 4,7*	69,8± 5,1*	33,9± 3,4*	38± 4,6*	55,8± 4,2*	38,7± 6,2	39± 5,5	71,4± 9,3*	24,6± 4,1*
жизнеспособность	44,7± 4,6*	32,2± 4,5*	64,1± 4,6*	25,4± 2,9*	30,7± 6,1	43,8± 3,3*	31,2± 5,2	28± 4,9*	57,8± 7,5*	15,4± 2,5*
	Потомки от 20-суточных родителей									
яйцепродукция	56,6± 3,6*	28± 8,4*	27,2± 2,3*	25,6± 7,2*	39,6± 9,0*	42,4± 11,0*	76,6± 8,0*	77± 9,0*	13,4± 5,7*	20± 5,9*
% рДЛМ	8,4± 0,9*	46,29±9,0*	8,3± 2,3*	43,9± 5,5*	15,3± 3,3*	34,4± 9,6*	10,9± 2,9*	26,8± 3,7*	19,6± 7,4	54,0± 9,5*
% пДЛМ	0,9± 0,2	18,8± 3,5*	0,8± 0,2	26,8± 4,6*	1,7± 1,3	15,6± 4,9*	2,5± 0,8	10,1± 2,2*	0,6± 0,1	21,7± 6,8*
плодовитость	44,3± 0,9*	34,8± 4,9*	62,8± 7,5*	27,8± 4,9*	24,1± 0,1*	51,1± 4,7*	31,8± 4,3	44,2± 3,9	65,5± 7,5*	16,9± 3,2*
жизнеспособность	37,0± 0,9*	25,7± 4,2*	56,3± 6,8*	17,1± 3,1*	19,6± 0,3*	36,2± 3,6*	23,4± 3,9	31,4± 3,6	51,5± 5,9*	10,1± 2,2*

Примечание: * – статистическая значимость отличий от контроля, $p < 0,001$.

С увеличением возраста родителей показатель яйцепродукции линий дикого типа C-S и Or снижался в среднем на 26,9 и 66,1% соответственно ($p < 0,001$). Для мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white*, также наблюдалось возраст-зависимое снижение данного показателя относительно контрольных значений. Исключение составили 10-суточные родители мутантной линии w^{or} , показатель яйцепродукции которых превышал значения контроля на 47,5%. Кроме того, статистически не значимое увеличение показателя яйцепродукции 10-суточных родителей наблюдалось для мутантных линий: w_{or} , w^{or} и w^{c-s} . Однако дальнейшее увеличение возраста родителей (20 суток) всех изучаемых мутантных линий способствовало постепенному снижению данного показателя. Дисперсионный анализ (табл. 2) подтвердил наличие зависимости яйцепродукции имаго *D. melanogaster* от возраста, $F=884,66$ ($p < 0,05$), и генотипа, $F=10,65$ ($p < 0,05$). Корреляционный анализ показал прямую зависимость между возрастом родителей линий дикого типа и мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white*, и показателем яйцепродукции, $r_s=0,73$ ($p < 0,05$).

Показатель ранней гибели эмбрионов (рДЛМ) в потомстве *D. melanogaster* (F_1) 3-суточных родителей мутантных линий зависел от генетического фона (табл. 2). При этом у мутантных линий, переведенных на генетический фон линии C-S, значения уровня рДЛМ достоверно превышали таковые, полученные для мутантных линий, переведенных на генетический фон Or ($p < 0,001$). Линии дикого типа по доле рДЛМ среди потомков 3-суточных родителей статистически не отличались. Наибольшие значения уровня рДЛМ в потомстве (F_1) от 3-суточных родителей были получены для линии w^{c-s} , а наименьшие – для w^{or} . Доля рДЛМ зависела от возраста родителей всех изучаемых линий. Так, уровень рДЛМ в эмбриогенезе снижался с возрастом родителей линий C-S и мутантных, переведенных на генетический фон C-S (табл. 1). А в линиях Or и мутантных, переведенных на генетический фон Or, уровень рДЛМ увеличивался с возрастом родителей.

Анализ доли пДЛМ среди потомков 3-суточных родителей показал статистически значимые различия между линиями дикого типа ($p < 0,001$). Для линии Or данный показатель превышал значения, полученные для линии C-S, в 4 раза ($p < 0,001$). У мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white*, доля пДЛМ среди потомков 3-суточных родителей существенно варьировала. пДЛМ не были обнаружены среди потомков 3-суточных родителей мутантной линии w_{or} ; минимальные значения данного показателя выявлены для линий: w^{sat}_{c-s} , w^{c-s} и w^{or} , а максимальные – для линии w^{sat}_{or} ($p < 0,001$) (табл. 1).

Уровень пДЛМ с возрастом родителей достоверно увеличивался ($p < 0,001$) относительно контрольных значений в линиях дикого типа Or и мутантных с генетическим фоном Or (табл. 1). Что касается линии дикого типа C-S и мутантных с генетическим фоном C-S, то доля пДЛМ статистически значимо увеличивалась у потомков 10-суточных родителей ($p < 0,001$), но у потомков 20-суточных родителей данный показатель достоверно не отличался от контрольных значений.

Дисперсионный анализ позволил установить, что на процент летальных мутаций в эмбриогенезе достоверно влияет аллельное состояние гена *white* ($F=9,50$, $p < 0,05$), возраст родителей ($F=791,62$, $p < 0,05$), комбинация этих двух факторов ($F=5,22$, $p < 0,05$), взаимодействие аллеля гена *white* и генетического фона ($F=2,73$); генетического фона и возраста родителей ($F=51,25$, $p < 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние аллельного состояния гена, генетического фона и возраста родителей на компоненты приспособленности *D. melanogaster*

Фактор	Яйцепродукция		% Σ ДЛМ		Плодовитость		Жизнеспособность	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Аллель	10,65	<0,001	9,50	<0,001	10,73	<0,001	14,40	<0,001
Генетический фон (Г.Ф.)	9,97	<0,001	0,03	>0,05	9,94	0,001	12,41	<0,001
Возраст	884,66	<0,001	791,62	<0,001	2433,8	<0,001	2353,13	<0,001
Аллель + Г.Ф.	6,96	<0,001	2,73	>0,05	7,90	<0,001	5,67	<0,001
Аллель + Возраст	4,45	0,001	5,22	<0,001	4,43	0,001	1,33	>0,05
Г.Ф. + Возраст	0,66	>0,05	51,25	<0,001	0,32	>0,05	2,55	>0,05
Аллель + Г.Ф. + Возраст	0,99	>0,05	1,51	>0,05	0,46	>0,05	0,51	>0,05

Установлена слабая прямая связь между возрастом родителей и долей рДЛМ и пДЛМ в эмбриогенезе потомков, $r_s=0,35$, $p<0,05$ и $r_s=0,55$, $p<0,05$ соответственно. В проведенном эксперименте не выявили зависимости между суммарной долей ДЛМ и пигментацией глаз у потомков 3-суточных родителей мутантных линий, переведенных на генетический фон C-S. Также не было установлено связи между степенью пигментации глаз и изучаемыми показателями приспособленности у потомков мутантных по локусу *white* имаго разных возрастов, имеющих генетический фон линии *Or*.

Компоненты приспособленности, такие как плодовитость и жизнеспособность потомков (F_1) 3-суточных родителей линий дикого типа, значительно отличались. При этом в линии C-S показатели плодовитости и жизнеспособности на 18,8 и 17,1% были ниже, чем в линии *Or* ($p<0,001$) (табл. 1). У потомков (F_1) 3-суточных родителей мутантных линий наибольшие показатели плодовитости и жизнеспособности были получены для линии w^{Or} , а наименьшие – для линии w^{C-S} (табл. 1). Кроме того, мутантные линии, переведенные на генетический фон C-S и *Or*, имели более низкие значения плодовитости и жизнеспособности по сравнению с изучаемыми линиями дикого типа ($p<0,01$) при возрасте родителей 3 суток.

Показатели плодовитости и жизнеспособности потомков зависели от возраста родителей. В данном исследовании были обнаружены межлинейные различия у потомков 10-суточных родителей. Для линий C-S, w_{C-S} , w_{C-S}^f , w_{C-S}^a , w_{C-S}^{sat} и w_{Or} наблюдалось статистически значимое увеличение данных показателей, а для линий *Or*, w_{Or} , w_{Or}^a , w_{Or}^{sat} – снижение. Следует отметить, что у 20-суточных родителей линий *Or* и мутантных с генетическим фоном *Or*, плодовитость и жизнеспособность потомков статистически значимо снижались по сравнению с контрольными значениями. В линиях C-S и мутантных с соответствующим генетическим фоном, те же показатели потомков (F_1) 20-суточных родителей превышали контрольные значения. Исключение составили линии w_{C-S}^a и w_{Or}^a , значения изучаемых показателей которых достоверно не отличались от контрольных значений, но были ниже, чем у потомков 10-суточных родителей (табл. 1).

Дисперсионный анализ факторов, влияющих на плодовитость и жизнеспособность потомков (F_1), показал достоверное влияние возраста родителей и генетических показателей (табл. 2). Корреляционный анализ показал прямую зависимость между возрастом родителей и их плодовитостью ($r_s=0,65$, $p<0,05$), а также между возрастом родителей и жизнеспособностью потомков ($r_s=0,85$, $p<0,05$).

Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают наличие влияния возраста родителей на показатели приспособленности потомков (F_1) линий дикого типа и мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white*.

Обсуждение

Исследование влияния возраста родителей на адаптивный потенциал потомков является актуальной задачей современной биологии. Известно, что с увеличением возраста в организме не только накапливаются многочисленные повреждения, но и происходит изменение экспрессии генов и эпигенетического паттерна (Анисимов, 2000; Eleftherianos, Castillo, 2012; Takahashi et al., 2001). Это способствует возникновению «новых» компенсаторных механизмов, направленных на поддержание жизнедеятельности организма на заключительном этапе онтогенеза. Однако основной проблемой остаётся постепенное снижение адаптивных возможностей организма на поздних стадиях онтогенеза, что приводит к развитию дегенеративно-дистрофических возрастных патологий (Charlesworth, 2001; Kudupali, Shivanna, 2013; Nusbaum, Rose, 1994). Возможно, с увеличением возраста организмов происходит природная селекция, направленная на снижение экспрессии генов, регулирующих физиологические и биохимические процессы, а также компенсаторно-адаптационные возможности. Снижение адаптационного потенциала негативно влияет на продолжительность жизни и репродуктивные возможности организмов (Rose, 2009).

Активно изучающимся остаётся вопрос, какое влияние оказывает возраст родителей на компоненты приспособленности потомков. Поэтому в данном исследовании был проведен сравнительный анализ показателей приспособленности потомков (F_1) от родителей разного возраста линий дикого типа C-S и *Or* и мутантных линий, различающихся аллелями локуса *white*, выравненных по генотипу. В работах, где влияние мутаций исследовали на линиях, выравненных по генотипу, доказано, что действие мутаций на продолжительность жизни и показатели приспособленности, может быть различным (Волкова та ін., 2011; Горенская и др., 2015; Золотих та ін., 2004).

Анализ компонентов приспособленности линий дикого типа и мутантных линий, выравненных по генотипу, представленный в данной работе, показал, что генетический фон и возраст родителей оказывает статистически значимое влияние на адаптивный потенциал потомков (F_1). Проведенное исследование показало, что у потомков линии дикого типа C-S и мутантных линий, выравненных по генотипу C-S, адаптивный потенциал улучшался с возрастом родителей (снижалась доля рДЛМ и ДЛМ, увеличивалась плодовитость и жизнеспособность). С возрастом родителей у потомков линии дикого типа Or и мутантных линий, выровненных по генотипу Or, адаптивный потенциал снижался (увеличивалась доля рДЛМ и ДЛМ, снижалась яйцепродукция, плодовитость и жизнеспособность). Ранее в работе (Волкова и др., 2005) были показаны сходные межлинейные различия в динамике изменения половой активности самцов – потомков родителей 3-, 11- и 21-суточного возраста. Авторы (Волкова и др., 2005) связывали данные различия с тем, что у самцов линии C-S независимо от возраста происходит постоянное расхождение избытка спермы в семенных пузырьках за счёт резорбции гамет, произвольной эякуляции и др. Постоянное обновление сперматозоидов сопровождается отсутствием накопления поврежденной ДНК, модификаций гистонов в ядре клеток. Оплодотворение яйцеклетки обновляющимися сперматозоидами, по-видимому, снижает зависимость показателей приспособленности потомков от возраста родителей. У стареющих самцов линии Or замедляется сперматогенез, что способствует накоплению зрелых сперматозоидов, чувствительных к действию повреждающих факторов. Это приводит к тому, что в оплодотворении яйцеклетки участвуют сперматозоиды, длительно хранящиеся в семенных пузырьках. Поэтому, вероятно, изученные нами показатели приспособленности, как и половая активность потомков (Волкова и др., 2005), определяются генотипом и зависят от возраста родителей.

Известно, что мутации в гене *white* у *D. melanogaster*, кодирующем трансмембранный ABC-переносчик, нарушают транспорт предшественников глазных пигментов, изменяя метаболизм триптофана и гуанина, биосинтез биогенных аминов и способствуя накоплению токсических метаболитов (Горенская и др., 2015; Костенко, Воробьева, 2012; Лопатина и др., 2007), что негативно влияет на приспособленность организма к изменяющимся факторам среды (Волкова та ін., 2011). Мутантные линии, различающиеся аллелями локуса *white*, отличаются степенью пигментации глаз и, по-видимому, характеризуются различиями в особенностях обмена триптофана и образования биогенных аминов в организме.

Установлено, что аллельное состояние гена *white* оказывает влияние на возраст-зависимое снижение яйцепродукции, на плодовитость имаго и жизнеспособность потомков (F_1), увеличение доли потомков, погибающих на стадии эмбриогенеза. При этом возрастные изменения показателя яйцепродукции затрагивали в большей степени потомков линий с мутацией w^{sat} , а в меньшей степени потомков линий с мутацией w^a . Показатели плодовитости и жизнеспособности потомков (F_1) в большей степени зависели от возраста родителей линии с мутацией w^{sat} , а в меньшей степени линий с мутациями w и w^{C-S} . Увеличение возраста родителей сильнее повлияло на уровень эмбриональной гибели потомков линий с мутацией w^{sat} , а в меньшей – линий с мутациями w и w^a . Следовательно, наибольшее снижение яйцепродукции, плодовитости, жизнеспособности и увеличение ДЛМ в эмбриогенезе было характерно для потомков линии, имеющей большую степень пигментации глаз – w^{sat} . Такой эффект можно объяснить тем, что в пигментных гранулах при данной мутации обнаруживается 79% ксантомматина, который участвует в обмене триптофана до стадии превращения кинуренина в 3-гидроксикинуренин. Накопление 3-гидроксикинуренина у имаго с мутацией w^{sat} индуцирует генерацию окислительных радикалов и оксидативный стресс (Захаров и др., 2011). Эта неспецифическая гормональная реакция сопровождается резким возрастанием уровня стресс-связанных гормонов: дофамина, октопамина, ювенильного гормона и экдистероидов, которые обеспечивают повышение энергетического метаболизма (Горенская и др., 2015), снижая репродуктивную функцию и формирование компонентов приспособленности (Rauschenbach et al., 2005).

Кроме того, в некоторых линиях *D. melanogaster*, например, в линиях дикого типа C-S и мутантных линиях – $white^{1118}$ и $white^{Dah}$ обнаружены консервативные механизмы (инсулиновый, фосфоинозитол-3-киназный и TOR (Target of Rapamycin) сигнальные пути), которые регулируют рост и развитие организма, плодовитость и жизнеспособность, интенсивность метаболизма и устойчивость к неблагоприятным факторам среды (Giannakou, Partridge, 2007; Martin, Hall, 2005; Tatar et al., 2001; Wigby et al., 2011). Данные сигнальные пути также необходимы для синтеза гормонов и биогенных аминов в многоклеточном организме. Наличие данных сигнальных путей у изучаемых нами

мутантных линий, различающихся аллелями гена *white*, требует дополнительного экспериментального исследования.

Таким образом, с увеличением возраста родителей линий дикого типа и мутантных линий, различающихся аллелями гена *white*, у потомков (F₁) снижаются показатели яйцепродукции, плодовитости и жизнеспособности, и увеличивается число доминантных летальных мутаций, особенно на ранних стадиях эмбриогенеза. При этом формирование изучаемых компонентов приспособленности (яйцепродукция, число доминантных летальных мутаций, плодовитость, жизнеспособность) у потомков зависит не только от возраста родителей, но и от генетического фона и аллельного состояния гена *white*.

Список литературы

- Анисимов В.Н. Современные представления о природе старения // Успехи современной биологии. – 2000. – Т.120, №2. – С. 146–164. /Anisimov V.N. Sovremennyye predstavleniya o prirode stareniya // Uspekhi sovremennoy biologii. – 2000. – Т. 120, №2. – С. 146–164./
- Волкова Н.Е., Немчук Н.В., Воробьева Л.И. Влияние возраста родителей на половое поведение *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина. Серия: биология. – 2005. – Вып. 1–2, №709. – С. 77–84. /Volkova N.Ye., Nemchuk N.V., Vorob'yova L.I. Vliyaniye vozrasta roditel'ey na polovoye povedeniye *Drosophila melanogaster* // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya. – 2005. – Vyp. 1–2, №709. – С. 77–84./
- Волкова Н.Е., Григор'ев Д.С., Костенко В.В., Воробйова Л.І. Вплив штучних перебудов генотипу на адаптивно значущі ознаки поведінки *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Серия: биология. – 2011. – Вып.14, №971. – С. 82–91. /Volkova N.Ye., Grygor'yev D.S., Kostenko V.V., Vorobyova L.I. Vplyv shtuchnykh perebudov genotypu na adaptivno znachushchi oznaky povedinky *Drosophila melanogaster* // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2011. – Vyp.14, №971. – С. 82–91./
- Воробьева Л.И., Романко А.И., Горенская О.В., Леонова И.С. Анализ показателей приспособленности *Drosophila melanogaster*, происходящих из природных популяций Иркутской области в условиях разной плотности культуры // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Серия: биология. – 2012. – Вып.15, №1008. – С. 86–93. /Vorob'yeva L.I., Romanko A.I., Gorenskaya O.V., Leonova I.S. Analiz pokazateley prisposoblennosti *Drosophila melanogaster*, proiskhodyashchikh iz prirodnykh populyatsiy Irkutskoy oblasti v usloviyakh raznoy plotnosti kul'tury // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya. – 2012. – Vyp. 15, №1008. – С. 86–93./
- Горенская О.В., Костенко В.В., Воробьева Л.И., Таглина О.В. Влияние аллельного состояния локуса *white* на некоторые показатели приспособленности у *Drosophila melanogaster* // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.1. – С. 74–79. /Gorenskaya O.V., Kostenko V.V., Vorob'yova L.I., Taglina O.V. Vliyaniye allel'nogo sostoyaniya lokusa white na nekotoryye pokazateli prisposoblennosti u *Drosophila melanogaster* // Visnyk problem biologiyi i medytsyny. – 2015. – Vyp.1. – С. 74–79./
- Захаров Г.А., Журавлев А.В., Паялина Т.Л. и др. Влияние мутаций кинуренинового пути обмена триптофана у *D. melanogaster* на локомоторное поведение и экспрессию генов глутаматергической и холинергической системы // Экологическая генетика. – 2011. – Т.9, №2. – С. 65–73. /Zakharov G.A., Zhuravlev A.V., Payalina T.L. i dr. Vliyaniye mutatsiy kinureninovogo puti obmena triptofana u *D. melanogaster* na lokomotornoye povedeniye i ekspressiyu genov glutamatergicheskoy i kholinergicheskoy sistemy // Ekologicheskaya genetika. – 2011. – Т.9, №2. – С. 65–73./
- Золотих І., Некрасова А., Шахбазов В. Роль системи генотипу та окремих видимих мутацій у визначенні тривалості життя *Drosophila melanogaster* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2004. – Вип.35. – С. 115–120. /Zolotykh I., Nekrasova A., Shakhbazov V. Rol' systemy genotypu ta okremykh vydumykh mutatsiy u vyznachenni tryvalosti zhyttya *Drosophila melanogaster* // Visnyk L'viv's'kogo universytetu. Seriya biologichna. – 2004. – Vyp.35. – С. 115–120./
- Костенко В.В., Воробьева Л.И. Влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на локомоторную активность имаго *Drosophila melanogaster* // Вестник Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Серия: биология. – 2012. – Вып.16, №1035. – С. 90–96. /Kostenko V.V., Vorob'yeva L.I. Vliyaniye aleley lokusa white i geneticheskogo fona na lokomotornuyu aktivnost' imago *Drosophila melanogaster* // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta imeni V.N. Karazina. Seriya: biologiya. – 2012. – Vyp.16, №1035. – С. 90–96./
- Костенко В.В., Колот Н.В., Воробйова Л.І. Вплив віку та голодування на яйцепродукцію имаго *Drosophila melanogaster* та порушення ембріонального етапу онтогенезу // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2014. – Вип.66. – С. 64–70. /Kostenko V.V., Kolot N.V., Vorobyova L.I. Vplyv viku ta goloduvannya na yaitseproduksiyu imago *Drosophila melanogaster* ta porushennya embrional'nogo etapu ontogenezu // Visnyk L'viv's'kogo universytetu. Seriya biologichna. – 2014. – Vyp.66. – С. 64–70./
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 351с. /Lakin G.F. Biometriya. – M.: Vysshaya shkola, 1990. – 351s./

- Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Мутации структурных генов метаболизма триптофана по кинурениновому пути в модуляции звеньев сигнального каскада – рецепторы глутамата-актин цитоскелета // Генетика. – 2007. – Т.43, №10. – С. 1396–1401. /Lopatina N.G., Zacheplilo T.G., Chesnokova Ye.G., Savvateyeva-Popova Ye.V. Mutatsii strukturykh genov metabolizma triptofana po kinureninovomu puti v moduliyatsii zven'yev signal'nogo kaskada – retseptory glutamata-aktin tsitoskeleta // Genetika. – 2007. – T.43, №10. – S. 1396–1401./
- Никоро З.С., Васильева Л.А. Проблема изменчивости и отбора по количественным признакам на примере популяции *Drosophila* // Дрозофила в экспериментальной генетике. – Новосибирск: Наука, 1978. – С. 196–243. /Nikoro Z.S., Vasil'yeva L.A. Problema izmenchivosti i otbora po kolichestvennym priznakam na primere populyatsii *Drosophila* // Drozofila v eksperimental'noy genetike. – Novosibirsk: Nauka, 1978. – S. 196–243./
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшейш. школа, 1973. – 320с. /Rokitskiy P.F. Biologicheskaya statistika. – Minsk: Vysheysh. shkola, 1973. – 320s./
- Тихомирова М.М. Генетический анализ. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. – 280с. /Tikhomirova M.M. Geneticheskii analiz. – L.: Izd-vo LGU, 1990. – 280s./
- Фролькис В.В. Адаптационно-регуляторная теория возрастного развития // Известия РАН. Серия биол. – 1992. – №4. – С. 631–634. /Frol'kis V.V. Adaptatsionno-regulyatornaya teoriya vuzrastnogo razvitiya // Izvestiya RAN. Seriya biol. – 1992. – №4. – S. 631–634./
- Ackermann M., Chao L., Bergstrom C.T., Doebeli M. On the evolutionary origin of aging // Aging Cell. – 2007. – Vol.6. – P. 235–244.
- Charlesworth B. Patterns of age-specific means and genetic variations of mortality rates predicted by the mutation-accumulation theory of aging // J. Theor. Biol. – 2001. – Vol.210. – P. 47–65.
- Christensen K., Johnson T.E., Vaupel J.W. The quest for genetic determinants of human longevity: challenges and insights // Nat. Rev. Genet. – 2006. – Vol.7. – P. 436–448.
- Eleftherianos I., Castillo J.C. Molecular mechanisms of aging and immune system regulation in *Drosophila* // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol.13. – P. 9826–9844.
- Giannakou M.E., Partridge L. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan // Trends Biochem. Sci. – 2007. – Vol.32. – P. 180–188.
- Kenyon C.J. The genetics of ageing // Nature. – 2010. – Vol.464. – P. 504–512.
- Kudupali S.L., Shivanna N. Influence of age on mating and fitness of *Drosophila melanogaster* // Dros. Inf. Serv. – 2013. – Vol.96. – P. 71–75.
- Martin D.E., Hall M.N. The expanding TOR signaling network // Current Opinion in Cell Biology. – 2005. – Vol.17. – P. 158–166.
- Nusbaum T.J., Rose M.R. Aging in *Drosophila* // Camp. Biochem. Physiol. – 1994. – Vol.109A, no.1. – P. 33–38.
- Paaby A., Schmidt P. Dissecting the genetics of longevity in *Drosophila melanogaster* // Fly. – 2009. – Vol.3. – P. 29–38.
- Rattan S.I.S. DNA damage and repair during cellular ageing // Int. Rev. Cytol. – 1998. – Vol.116. – P. 47–88.
- Rattan S.I.S., Derventzi A., Clark B.F.C. Protein synthesis, posttranslational modifications, and ageing // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1992. – Vol.663. – P. 48–62.
- Rauschenbach I.Y., Shumnaya L.V., Khlebodarova T.M. et al. Role of phenol oxidases and tyrosine hydroxylase in control of dopamine content in *Drosophila virilis* under normal conditions and heat stress // J. Insect Physiol. – 2005. – Vol.41. – P. 279–286.
- Rose M.R. Adaptation, aging, and genomic information // Aging. – 2009. – Vol.1, no.5. – P. 444–451.
- Takahashi Y., Kuro M., Ishikawa F. Aging mechanisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol.97. – P. 12407–12408.
- Tatar M., Kopelman A., Epstein D. et al. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function // Science. – 2001. – Vol.292. – P. 107–110.
- Wigby S., Slack C., Gronke S. et al. Insulin signalling regulates remating in female *Drosophila* // Proc. R. Soc. B. – 2011. – Vol.278. – P. 424–431.

Представлено: Ю.О.Божкова / Presented by: Yu.O.Bozhkova

Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova

Подано до редакції / Received: 27.10.2015

••• ЗООЛОГІЯ ТА ЕКОЛОГІЯ ••• ZOOLOGY AND ECOLOGY •••

УДК: 551.468.3(262.5)

Половая структура популяции и цикл размножения *Lekanesphaera monodi* (Arcangeli, 1934) (Crustacea, Isopoda) в сообществе обрастания Одесского залива Черного моря
А.Ю.Варигин

Институт морской биологии НАН Украины (Одесса, Украина)
sealife_1@mail.ru

Изучена половая структура популяции и особенности цикла размножения *Lekanesphaera monodi* в сообществе обрастания Одесского залива Черного моря. Показана годовая динамика соотношения полов у этих ракообразных. Отмечено, что размножение *L. monodi* начинается поздней весной и заканчивается поздней осенью, но наиболее интенсивно этот процесс происходит летом. Приведены данные по плодовитости этого вида в условиях сообщества обрастания. Показана связь этого параметра с длиной и массой ракообразных. Приведены уравнения зависимости сырой и сухой массы самцов, яйценосных и неядценосных самок *L. monodi* от их длины.

Ключевые слова: *Lekanesphaera monodi*, годовая динамика соотношения полов, цикл размножения, плодовитость, сообщество обрастания, Одесский залив.

Статева структура популяції і цикл розмноження *Lekanesphaera monodi* (Arcangeli, 1934) (Crustacea, Isopoda) в угрупованні обростання Одеської затоки Чорного моря
О.Ю.Варігін

Вивчена статева структура популяції та особливості циклу розмноження *Lekanesphaera monodi* в угрупованні обростання Одеської затоки Чорного моря. Показана річна динаміка співвідношення статей у цих ракоподібних. Відзначено, що розмноження *L. monodi* починається пізньою весною і закінчується пізно восени, але найбільш інтенсивно цей процес відбувається влітку. Наведено дані по плодючості цього виду в умовах угруповання обростання. Показано зв'язок цього параметра з довжиною і масою ракоподібних. Наведено рівняння залежності сирої та сухої маси самців, яйценосних і неядценосних самок *L. monodi* від їх довжини.

Ключові слова: *Lekanesphaera monodi*, річна динаміка співвідношення статей, цикл розмноження, плодючість, угруповання обростання, Одеська затока.

Sexual structure of population and reproduction cycle of *Lekanesphaera monodi* (Arcangeli, 1934) (Crustacea, Isopoda) in the fouling community of the Odessa Bay, Black Sea
A.Yu.Varigin

The sexual structure of population and specificities of reproduction cycle of *Lekanesphaera monodi* in the fouling community of the Odessa Bay, Black Sea have been studied. Annual changes of the sex ratio in the crustacean have been shown. The reproduction of *L. monodi* begins in late spring and ends in late autumn, but most intensively this process occurs in summer. The data on fertility of this species in the conditions of fouling community have been presented. The relationship of this parameter with length and weight of the crustacean have been shown. The equations of the dependence of wet and dry weights of males, oviparous and nonoviparous females of *L. monodi* on their length have been presented.

Key words: *Lekanesphaera monodi*, annual changes of sex ratio, reproduction cycle, fertility, fouling community, Odessa Bay.

Введение

Как известно, *Lekanesphaera monodi* является представителем равноногих ракообразных семейства Sphaeromatidae, который широко распространен в Средиземном, Черном и Азовском морях (Кусакин, 1979). Этот вид, как и многие обитатели прибрежной зоны моря, отличается высокой

ступеню зврибионтності. Обитає обычно на невеликих глибинах среди камней и водорослей (Маккавеева, 1992). Выносит повышение температуры воды до 31°C (Куцакин, 1969). Хорошо адаптирован к жизни в широком диапазоне солености воды (Паули, 1954). По способу питания этот вид относится к полифагам. Он активно питается как растительной, так и животной пищей, иногда может потреблять падаль (Паули, 1954). В то же время эти ракообразные являются пищевым объектом для некоторых видов рыб (Kvach, Zamorov, 2001).

У *L. monodi* хорошо выражен половой диморфизм. Самцы, достигающие длины 10 мм, как правило, на четверть крупнее самок. На II плеоподу у них расположен саблевидный мужской отросток, обычно далеко выдающийся за дистальный край эндоподита. Самки вынашивают оплодотворенные яйца и развивающиеся эмбрионы во внутренних выводковых мешочках, образованных парными впячиваниями кожных покровов на вентральной стороне их грудных отделов (Куцакин, 1979).

Черноморские представители ракообразных семейства Sphaeromatidae, ввиду их доступности и неприхотливости, часто использовались в качестве объектов для исследования проблем роста и энергетического обмена у морских беспозвоночных (Аболмасова, 1987; Аболмасова и др., 1986; Маккавеева, 1974; Печень-Финенко и др., 1986). Эти экспериментальные работы проводились на особях, обитающих в прибрежных районах Крыма. В северо-западной части Черного моря детальное изучение особенностей жизненного цикла *L. monodi* не проводилось.

Цель данной работы состояла в выяснении годовой динамики половой структуры и характера цикла размножения *L. monodi* в прибрежном сообществе обрастания Одесского залива, где это ракообразное является массовым видом.

Объекты и методы исследования

Материалом для работы послужили пробы, отобранные на подводной поверхности берегозащитных сооружений, расположенных в прибрежной зоне Одесского залива. Пробы отбирали ежемесячно с января по декабрь 2013 г. с помощью металлической рамки, размером 20×20 см, обтянутой мельничным газом. Содержимое каждой рамки промывали через систему почвенных сит с минимальным размером ячеек 0,5 мм. Собранных ракообразных идентифицировали, определяли их половую принадлежность, измеряли длину (расстояние от переднего края головы до конца тельсона) с точностью до 0,1 мм и сырую массу (предварительно обсушив животных на фильтровальной бумаге) с точностью до 0,001 г. Параметры сухой массы животных определяли с точностью до 0,001 г. после высушивания особей в сушильном шкафу в течение 48 часов при температуре 60°C.

Абсолютную плодовитость ракообразных – общее число яиц, образуемое самкой за один помет, определяли с помощью прямого подсчета яиц у каждой яйценосной самки. Для установления связи между размерными и весовыми характеристиками ракообразных, а также между параметрами абсолютной плодовитости и длиной (массой) самок *L. monodi* использовали корреляционно-регрессионный анализ. Полученные данные представляли в виде степенных уравнений вида

$$Y = a \cdot X^b \quad (1)$$

где: X и Y – параметры длины, массы или плодовитости, a и b – коэффициенты.

Коэффициенты a и b находили из линейной формы уравнения (1)

$$\ln Y = \ln a + b \cdot \ln X \quad (2)$$

При проведении корреляционно-регрессионного анализа использовали выборки из всего размерного ряда ракообразных в количестве от 46 до 52 особей. Всего за период исследований изучено 1116 экземпляров *L. monodi*.

Результаты и обсуждение

Как известно, половая структура популяции определяет репродукционные возможности вида в конкретных условиях среды обитания. Изменчивость половой структуры в течение года связана, как правило, с особенностями цикла размножения животных. При этом у каждого вида в той или иной стадии этого цикла наблюдается характерное соотношение полов, необходимое для успешного проведения процесса репродукции (Хмелева, 1988).

Как показали проведенные исследования половая структура *L. monodi* в сообществе обрастания Одесского залива проявляла определенную изменчивость в разные сезоны года (рис. 1).

Так, зимой в январе, когда температура морской воды составляла 4°C, количество самок в три раза превышало число самцов. В это время в популяции встречались взрослые особи, предыдущей генерации. Затем, в конце зимы – начале весны количество самцов увеличивалось, хотя число самок неизменно оставалось вдвое больше. В конце марта, когда температура воды составляла около 10°C, ракообразные начинали спариваться. При этом самец удерживает самку под вентральным сводом своего тела и не отпускает до тех пор, пока у нее не начнется линька. Оплодотворение происходит лишь после того, как самка сбросит свои хитиновые покровы. Развитие оплодотворенных яиц в выводковых мешочках самок продолжается около двух месяцев (Маккавеева, 1974).

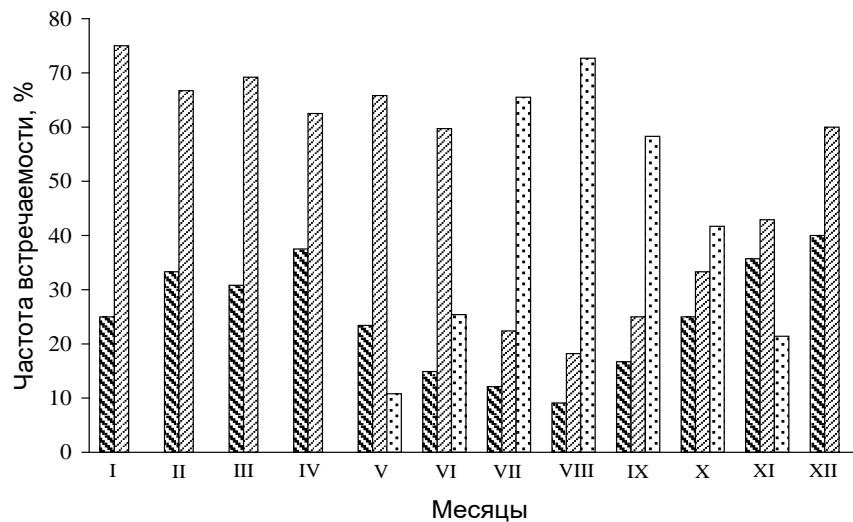


Рис. 1. Годовая динамика соотношения самцов (темная штриховка), самок (светлая штриховка) и неполовозрелых особей (точки) *Lekanesphaera monodi* в сообществе обрастания Одесского залива

Первая молодь начала появляться в мае, когда морская вода прогрелась до 20°C. При этом количество взрослых самцов предыдущего поколения постепенно сокращалось, ввиду того, что они массово погибали после выполнения своей основной функции. В связи с этим относительное количество самок увеличивалось. В июне они уже вчетверо превышали число самцов (рис. 1). В этом месяце начался массовый выход молодежи из выводных мешочков самок. В июле отнерестившиеся самки также стали погибать, и их относительная численность снизилась до 22,4%. При этом молодь составляла уже 65,5%, а в августе достигла максимума – 72,7% от общей численности популяции. Первое время после рождения эта молодь имеет мягкие покровы и практически беззащитна. В сообществе обрастания среди друз мидий, прикрепленных к субстрату многочисленными нитями биссуса, ювенильные особи *L. monodi* находят для себя пищу и убежище.

В течение осеннего периода происходил рост ранее родившейся молодежи, хотя появление на свет молодых ракообразных не прекращалось до ноября, когда температура воды была около 10°C. В декабре количество самок в полтора раза превышало число самцов. При этом отмечалось резкое снижение общей численности *L. monodi* в сообществе обрастания Одесского залива. В зимние месяцы, когда температура воды составляла 4–6°C, в пробах были обнаружены лишь единичные экземпляры ракообразных. Подобное явление отмечено у ракообразных семейства Sphaeromatidae, обитающих у берегов Крыма (Маккавеева, 1974).

Приведенная динамика соотношения самцов, самок и неполовозрелых особей *L. monodi* отражает особенности репродуктивного цикла изучаемого вида в сообществе обрастания Одесского залива Черного моря. При описании количественных аспектов процесса размножения этих ракообразных необходимо знать особенности их масс-размерных соотношений в конкретных условиях обитания. Для этого был определен характер связи между длиной и сырой (сухой) массой самцов, яйценосных и неядценосных самок, обитающих в сообществе обрастания (табл. 1, 2).

Как следует из данных, представленных в табл. 1, между сырой массой ракообразных и длиной их тела существует устойчивая корреляционная связь. Коэффициенты корреляции уравнений (2) во

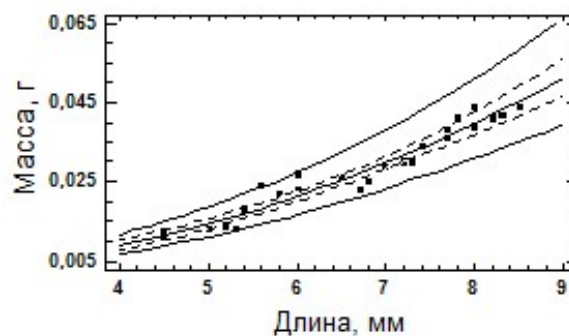
всех случаях составляют от 0,923 до 0,965. Для графической иллюстрации полученных связей в качестве примера приведен график зависимости сырой массы яйценосных самок *L. monodi* от длины их тела (рис. 2).

Таблица 1.

Параметры уравнения (2) зависимости сырой массы самцов, неяйценосных и яйценосных самок *Lekanesphaera monodi* от длины их тела

<i>L. monodi</i>	$\ln a$	S.e. $\ln a$	b	S.e. b	r	St. er.
Самцы	-9,1625	0,4728	2,8652	0,2341	0,9652	0,0568
Неяйценосные самки	-8,5739	0,3053	2,6898	0,1667	0,9636	0,1163
Яйценосные самки	-7,7419	0,3328	2,2675	0,1853	0,9231	0,1485

Примечание: $\ln a$ и b – коэффициенты уравнения (2), S.e. $\ln a$ и S.e. b – стандартные ошибки коэффициентов $\ln a$ и b , r – коэффициент корреляции, St. er. – стандартная ошибка уравнения (2).

Рис. 2. Зависимость сырой массы яйценосных самок *L. monodi* от длины их тела

Связь между сухой массой самцов, неяйценосных и яйценосных самок и длиной их тела также носит устойчивый характер. Коэффициенты корреляции уравнений (2) во всех случаях составляют от 0,893 до 0,923 (табл. 2).

Таблица 2.

Параметры уравнения (2) зависимости сухой массы самцов, неяйценосных и яйценосных самок *Lekanesphaera monodi* от длины их тела

<i>L. monodi</i>	$\ln a$	S.e. $\ln a$	b	S.e. b	r	St. er.
Самцы	-9,6553	0,7885	2,5668	0,3504	0,8928	0,0948
Неяйценосные самки	-9,9445	0,5108	2,7498	0,5108	0,9056	0,1373
Яйценосные самки	-9,9808	0,4172	2,8426	0,2324	0,9230	0,1862

Примечание: условные обозначения такие же, как в табл. 1.

Как известно, плодовитость считается основным репродуктивным показателем, определяющим воспроизводительную способность животных. От количества вышедшей из яиц жизнеспособной молодежи во многом зависит процветание данного вида в конкретных условиях обитания (Хмелева, 1988). У ракообразных, как и у других пойкилотермных животных, абсолютная плодовитость связана с длиной, а значит и массой самок. С увеличением размеров ракообразных возрастает и количество продуцируемых ими яиц (Хмелева, 1988). Проведенные расчеты подтвердили существование такой связи для самок *L. monodi*, обитающих в сообществе обрастания Одесского залива (табл. 3).

Как свидетельствуют данные, приведенные в табл. 3, между показателями абсолютной плодовитости и длиной (массой) ракообразных существует устойчивая корреляционная связь. Коэффициенты корреляции в соответствующих уравнениях (2) составляют 0,87 и 0,89. Проведенные расчеты показали, что во всех уравнениях регрессии параметры p были менее 0,05, что свидетельствует о статистически значимой связи между изучаемыми показателями на уровне 95%.

Таблица 3.
Параметры уравнения (2) зависимости абсолютной плодовитости *Lekanesphaera monodi* от длины и сырой массы их тела

<i>L. monodi</i>	ln a	S.e. ln a	b	S.e. b	r	St. er.
Длина, мм	-1,4139	0,5881	2,7936	0,3551	0,8748	0,1994
Масса, г	8,3017	0,6496	1,2848	0,1633	0,8936	0,1896

Примечание: условные обозначения такие же, как в табл. 1.

В сообществе обрастания Одесского залива Черного моря максимальное количество яиц (абсолютная плодовитость), продуцируемых самкой *L. monodi* предельного размера (длина 7,5 мм, сырая масса 0,042 г), составляло 68. Абсолютная плодовитость самки минимального размера (длина 4,4 мм, сырая масса 0,013 г) составила 16 яиц. Независимо от размеров самок и параметров их плодовитости длина молоди, выходящей из их выводных мешочков, составляла от 1,3 до 1,4 мм.

Выводы

В результате проведенных работ было выяснено, что динамика половой структуры популяции *L. monodi* обусловлена особенностями цикла размножения этого вида в условиях сообщества обрастания Одесского залива Черного моря. Количественное преобладание самок над самцами наблюдается в течение всего года. Процесс размножения *L. monodi* происходит в теплый сезон года в течение семи месяцев с мая по ноябрь. Пик массовой репродукции приходится на летний период (июль – август). Максимальная абсолютная плодовитость самок *L. monodi* составляет 68 яиц.

Список литературы

- Аболмасова Г.И. Влияние температуры на интенсивность обмена и скорость роста изоподы *Sphaeroma serratum* Fabr. // Экология моря. – 1987. – Вып.26. – С. 77–82. /Abolmasova G.I. Vliyaniye temperatury na intensivnost' obmena i skorost' rosta izopody *Sphaeroma serratum* Fabr. // Ekologiya morya. – 1987. – Vyp.26. – S. 77–82./
- Аболмасова Г.И., Печень-Финенко Г.А., Романова З.А. Баланс энергии двух популяций равноногих ракообразных в Черном море // Экология моря. – 1986. – Вып.24. – С. 64–69. /Abolmasova G.I., Pechen'-Finenko G.A., Romanova Z.A. Balans energii dvukh populyatsiy ravnonogikh rakoobraznykh v Chernom more // Ekologiya morya. – 1986. – Vyp.24. – S. 64–69./
- Кусакин О.Г. Отряд Isopoda // Определитель фауны Черного и Азовского морей. – Киев: Наук. думка, 1969. – С. 408–440. /Kusakin O.G. Otryad Isopoda // Opredelitel' fauny Chernogo i Azovskogo morey. – Kiyev: Nauk. dumka, 1969. – S. 408–440./
- Кусакин О.Г. Морские и солоноватоводные равноногие ракообразные (Isopoda) холодных и умеренных вод северного полушария. Подотряд Flabellifera. – Л.: Наука, 1979. – 742с. /Kusakin O.G. Morskiye i solonovатоводные ravnonogiyе rakoobraznyye (Isopoda) kholodnykh i umerennykh vod severnogo polushariya. Podotryad Flabellifera. – L.: Nauka, 1979. – 742s./
- Маккавеева Е.Б. Рост и продукция *Sphaeroma serratum* Fabr. в Черном море // Биология моря. – 1974. – Вып.32. – С. 43–52. /Makkaveyeva Ye.B. Rost i produktsiya *Sphaeroma serratum* Fabr. v Chernom more // Biologiya morya. – 1974. – Vyp.32. – S. 43–52./
- Маккавеева Е.Б. Экология клешненосных осликов (Anisopoda) и равноногих раков (Isopoda) в Черном море // Вестник зоологии. – 1992. – №5. – С. 46–50. /Makkaveyeva Ye.B. Ekologiya kleshnenosnykh oslikov (Anisopoda) i ravnonogikh rakov (Isopoda) v Chernom more // Vestnik zoologii. – 1992. – №5. – S. 46–50./
- Паули В.Л. Свободноживущие равноногие ракообразные Черного моря (Isopoda non parasitica) // Труды Севастопольской биол. станции. – 1954. – Т.8. – С. 100–135. /Pauli V.L. Svobodnozhivushchiye ravnonogiyе rakoobraznyye Chernogo morya (Isopoda non parasitica) // Trudy Sevastopol'skoy biol. stantsii. – 1954. – T.8. – S. 100–135./
- Печень-Финенко Г.А., Аболмасова Г.И., Романова З.А. Энергетический бюджет двух видов равноногих ракообразных // Экология моря. – 1986. – Вып.23. – С. 54–64. /Pechen'-Finenko G.A., Abolmasova G.I., Romanova Z.A. Energeticheskiy byudzhет dvukh vidov ravnonogikh rakoobraznykh // Ekologiya morya. – 1986. – Vyp.23. – S. 54–64./
- Хмелева Н.Н. Закономерности размножения ракообразных. – Минск: Наука и техника, 1988. – 208с. /Khmeleva N.N. Zakonomernosti razmnozheniya rakoobraznykh. – Minsk: Nauka i tekhnika, 1988. – 208s./
- Kvach Y., Zamorov V. Feeding preferences of the round goby *Neogobius melanostomus* and mushroom goby *Neogobius cephalagres* in Odessa Bay // Oceanol. Stud. – 2001. – Vol.30, № 3–4. – P. 91–101.

Представлено: А.В.Курилов / Presented by: A.V.Kurilov
Рецензент: С.Ю.Утевський / Reviewer: S.Yu.Utevsky
Подано до редакції / Received: 14.04.2016

УДК: 599.322.2 (477)

**История изучения популяции красного сурка (*Marmota caudata* Geoff., 1842)
в западной части Таласского Алатау**
В.А.Токарский

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)
v.tokarsky@mail.ru

Проведен детальный анализ литературных данных, касающихся состояния популяции красного сурка на территории заповедника Аксу-Джабаглы, полученных на протяжении XX–XXI столетий. Поселения сурков сосредоточены исключительно на высокогорных жайляу в поясе альпийских степей и верхней субальпийки, на высоте 2000–3000 метром над ур. м., и приурочены к ручьям, выходам грунтовых вод и снежникам, где зверьки в течение сезона обеспечены травянистым сочным кормом. К настоящему времени ареал сурков принял пятнистый характер с мозаичным и ленточным типом поселений. На площади 1800 га обитает 102 семьи (приблизительно 320–330 особей). Заселенные участки площадью 0,5 до 2 км² относительно изолированы друг от друга с плотностью 0,06 сем./га. Таким образом, 22700 особей красного сурка мы считаем реальным числом на территории Аксу-Жабаглинского заповедника. Это число характеризует ядро казахстанской популяции. Полученные данные могут служить отправной точкой для объективного прогнозирования численности сурков в существующих природных поселениях.

Ключевые слова: *красный сурок, Таласский Алатау, популяция, ареал, численность, история.*

**Історія вивчення популяції червоного бабака (*Marmota caudata* Geoff.,
1842) у західній частині Таласького Алатау**
В.А.Токарський

Проведено детальний аналіз літературних даних щодо стану популяції червоного бабака на території заповідника Аксу-Джабагли, отриманих протягом XX–XXI століть. Поселення бабаків зосереджені виключно на високогірних жайляу в поясі альпійських степів і верхньої субальпійки, на висоті 2000–3000 метрів над р. м., і приурочені до струмків, виходів ґрунтових вод і сніжників, де звірята протягом сезону забезпечені трав'янистим соковитим кормом. У теперішній час ареал бабаків прийняв плямистий характер з мозаїчним і стрічковим типом поселень. На площі 1800 га мешкає 102 родини (приблизно 320–330 особин). Заселені ділянки площею 0,5 до 2 км² відносно ізольовані одна від одної з щільністю 0,06 родин на гектар. Таким чином, 22700 особин червоного бабака ми вважаємо реальним числом на території Аксу-Жабаглинського заповідника. Це число характеризує ядро казахстанської популяції. Отримані дані можуть служити відправною точкою для об'єктивного прогнозування чисельності бабаків в існуючих природних поселеннях.

Ключові слова: *червоний бабак, Таласький Алатау, популяція, ареал, чисельність, історія.*

**The history of the study of the red marmot (*Marmota caudata* Geoff., 1842)
population in the western part of the Talas Alatau**
V.A.Tokarsky

The detailed analysis of the literature data of XX–XXI centuries concerning the population status of the red marmot on the territory of the Aksu-Zhabagly Nature Reserve has been conducted. Marmots' settlements concentrate exclusively in the highlands (zhailau) in the belt of alpine steppes and high sub-alpine, at an altitude of 2000–3000 meters above sea level and are confined to streams, outputs of groundwater and snowfields where the animals during the season are provided by a grassy juicy food. To date, marmot area has patchy character with mosaic and belt type of settlements. The area of 1800 hectares is inhabited by 102 families (about 320–330 individuals). Plots from 0.5 to 2 km² are relatively isolated from each other with a density of 0.06 families for hectare. Thus, 22,700 individuals of the red marmot are suggested to be the real number in the territory of Aksu-Zhabagly Nature Reserve. This number describes the core of Kazakhstan's population. The obtained data can serve as a starting point for objective forecasting of marmot population in the existing natural settlements.

Key words: *red marmot, Talas Alatau, population, area, number, history.*

Введение

Красный, или длиннохвостый, сурок (*Marmota caudata* Geoffrey), высокогорный вид представителей рода *Marmota*. Он населяет Западный и Южный Тянь-Шань, высокогорные хребты Гиссара-Дарваза и пустынные нагорья Памира, где вместе с немногими другими представителями позвоночных животных (большеухая пищуха, тибетский и гималайский улары) поднимается до 5000 м н.у.м. Ареал этого вида уходит в пределы Центральной Азии, где детали его распространения и экология почти не изучены (Кизилов, Берендяев, 1978).

Поскольку условия обитания и экология красного сурка в Тянь-Шанской части ареала, расположенной главным образом в Киргизии, и на Памире, находящемся в Таджикистане, весьма различны, его распространение и основные особенности жизни на территориях этих республик в монографии «Сурки. Распространение и экология» (1978) рассматривались отдельно. Распространение красного сурка в Казахстане не затрагивалось.

Красный сурок заселяет различные пояса гор, причем наиболее привязан к местам с расчлененным рельефом. Лишь в немногих широких межгорных котловинах и речных долинах (например, р. Кызылсу в Алайской долине) зверьки образуют значительные поселения. У нижнего предела распространения (600–800 м) сурки селятся по небольшим долинам, впадинам, среди холмов и увалов. С увеличением абсолютной высоты местности их поселения становятся сплошными, плотность населения зверьков заметно увеличивается. В высокогорье наиболее благоприятными местообитаниями являются луговые степи (рис. 1).

Верхняя граница распространения совпадает со снеговой линией и нижней границей ледяных полей (4000–4500 м). Поселения зверьков здесь разрежены и приурочены к мезофильным лужайкам на хорошо прогреваемых склонах. Большая амплитуда высот территорий, заселенных сурком в горах Средней Азии, и разнообразие местообитаний послужили причиной укоренившегося представления о большой пластичности этого вида (Айзин, 1983; Благодарова, 1947; Давыдов, 1967). Однако теперь это представление вызывает большое сомнение. Общие закономерности стациального и вертикального размещения сурков, описанные Д.И.Бибиковым и И.И.Стоговым (1957), вполне подтверждается и распространением красного сурка.



Рис. 1. В высокогорье наиболее благоприятными местообитаниями являются луговые степи

Так, в более теплых низкогорных частях ареала это животное заселяет теневые хорошо увлажненные склоны гор, на которых длительно вегетирует растительность. В среднегорье и на

высокогорных участках сурок предпочитает селиться на склонах южной и юго-восточной экспозиций, где быстрее сходит снег и раньше развиваются растения. Широко заселены в этих поясах также выровненные участки и долины рек. У верхнего предела распространения сурков можно встретить только на склонах южной экспозиции, которые весной раньше освобождаются от снега.

Отдельные исследования экологии длиннохвостого сурка проводились в 40-х (Янушко, 1943) и 60-х годах XX ст. (Ковшарь, Янушко, 1965). В 1942–1943 гг. в заповеднике был проведен учет численности сурков, картирование колоний, изучалась суточная активность, устройство нор животных. Длительный период, в последующие годы, специальных исследований и учетов сурков в заповеднике не проводили.

В настоящей работе на основании исторических данных о популяции, анализе топографических особенностей местности и связанных с ними закономерностях расселения животных мы сделали попытку проследить историческое изменение численности и, соответственно, скорректировать имеющиеся данные о темпах роста численности и динамики ареала. Полученные данные могут служить отправной точкой для объективного прогнозирования численности сурков в существующих природных поселениях.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили литературные данные по распространению и динамике численности красного сурка, полученные на протяжении XX–XXI столетий рядом исследователей. Особенно ценной является рукопись П.А.Янушко (1943), которая посвящена распространению красного сурка.

Территория заповедника занимает в меридиональном направлении 53 км (от 70°18' до 70°57' в.д.), в широтном направлении – 41 км (42°08'–42°30' с.ш. по системе координат 1942 г.). Аксу-Джабаглинский государственный природный заповедник занимает северо-западную оконечность Таласского Алатау с его широтно-вытянутыми западными, частично северными отрогами и примыкающие к главному хребту северо-восточные склоны Угамского хребта. Высотные границы заповедника здесь колеблются от 1300 до 4200 м над ур. м. Отроги представляют собой отдельные водораздельные хребты значительной высоты. С востока заповедник ограничивает боковой отрог, разделяющий бассейны рек Арабиик и Коксай. Несколько западнее, от вершин основного хребта Сарытау (3657,2 м) и Аксуат (4027,4 м) ответвляются отроги, являющиеся водоразделами рек Коксай, Аксай и Джабаглы. Наивысшие абсолютные отметки вдоль боковых водораздельных гребней меняются от 3401,1 м до 3977,1 м. Ущелья рек Коксай и Аксай на всем своем протяжении имеют меридиональное простирание (юг–север) и представляют собой крутосклонные V-образные долины (Ковшарь, 2006).

Реки Коксай и Аксай – единственные в заповеднике, которые относятся к бассейну реки Талас. От горного узла в районе вершины Аксуат отходит ряд отрогов: Алатау (пик Каскабулак 3831,9 м), Бугулутор (3926,3 м) и Аксуйский (3795,8 м). Все они имеют преимущественно широтное направление и являются водораздельными хребтами бассейна реки Арысь, крупного правобережного притока Сырдарьи. Общая площадь заповедника составляет 128118,1 га.

Наши полевые исследования проводились в июле 2014 г. в верховьях реки Топшак на территории Аксу-Джабаглинского государственного природного заповедника, расположенного в западной оконечности хребта Таласский Алатау в Западном Тянь-Шане на территории Толебийского и Тюлькубасского районов Южно-Казахстанской области и Жуалинского района Жамбылской области. Хребет Джабаглытау, ограничивающий заповедник с севера, сравнительно невысок (высшая точка 2913,1 м), примыкает к платообразному участку р. Топшак, водораздела Аксай – Джабаглы. От южного склона Таласского Алатау в юго-западном направлении отходит крупный отрог – Угамский, ограничивающий с севера долину реки Майдантал, притока реки Пскем. Высшая точка Угамского хребта, пик Сайрамский (4238,6 м), является крайней юго-западной точкой заповедника (рис. 2).

Поскольку поселения сурков сосредоточены исключительно на высокогорных жайляу в поясе альпийских степей и верхней субальпика, на высоте 2000–3000 метром над ур. м., и приурочены к ручьям, выходам грунтовых вод и снежникам, где зверьки в течение сезона обеспечены травянистым сочным кормом, при последующем анализе данных по численности и распространению сурка учитывали особенности топографии местности в пределах каждой колонии. Это принадлежность сети к бассейну той или иной реки, ее протяженность, связанность с другими системами, наличие или

отсутствие обширных разобщающих горных массивов между соседними высокогорными жайляу и т. д. (рис. 3, 4).

Работу проводили в два этапа:

1. Картирование поселений при помощи GPS-навигатора.
2. Подсчет числа особей в семье.

Общее число семей под наблюдением – 10. Наблюдения проводили 23–28 июля 2014 г. Наблюдения вели в бинокль из укрытия сразу же после выхода зверьков с 7⁰⁰ до 10⁰⁰ часов и затем в вечернее время с 17⁰⁰ до 20⁰⁰. В ряде случаев вели визуальный учет на маршруте: проходя пешком, отмечали число зверьков в каждой семье. Учет проводили в течение 3-х дней. На каждой площадке мы подсчитывали число семей (семейных участков), общее число взрослых и общее число сеголетков. Разделив затем число взрослых (или число сеголетков) на число семей, получали усредненные данные.

Для анализа распределения поселений сурков на местности было использовано электронное изображение, составленное на основе топографических карт (масштаб 1:100 000). На данную основу были спроецированы границы местной популяции.

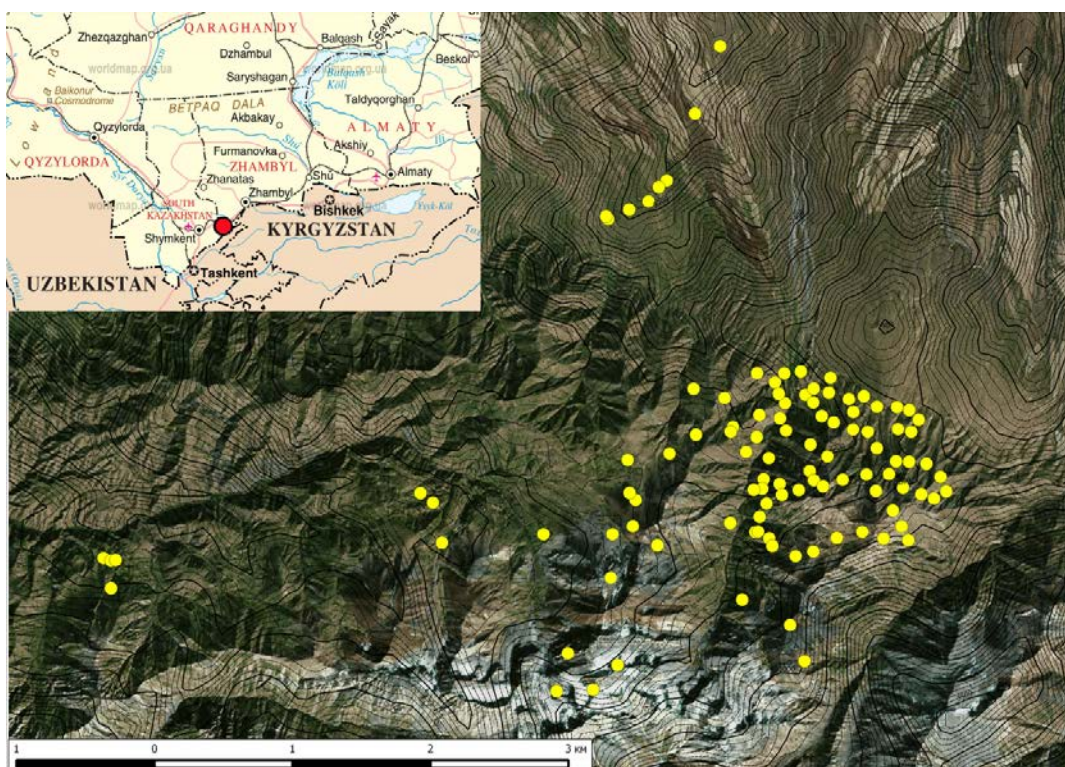


Рис. 2. Полевые исследования проводились в июле 2014 г. в урочище «Топшак-сазы» верховья реки Топшак на территории Аксу-Джабаглинского государственного природного заповедника

Результаты и обсуждение

Р.Н.Мекленбурцев (1934) в своей рукописи «Млекопитающие заповедника Аксу-Джабаглы» отмечал: «Еще недавно, два-три года назад, сурки громадными колониями населяли все подходящие места в долинах заповедника. Теперь же, пройдя всю долину Джабаглы и большую часть Кыты-Аксу, я смог увидеть всего лишь 16 сурков и сотни пустых нор. Нужно отметить, что и эти остатки уцелели там, куда затруднен доступ, в самых глухих уголках. Сурки страшно пугливы. Мне приходилось видеть их в этих же местах в 1926 г.; тогда они беззаботно кормились, бегали и перекликались у своих нор на глазах человека. Теперь стоит только показаться где-

нибудь вдали, как уцелевшие от колонии 2–3 сурка поднимают страшную тревогу и надолго скрываются в норы».

Основной причиной снижения численности автор называет их прямое истребление. О распределении сурков по заповеднику Р.Н.Мекленбурцеву пришлось судить по старым заброшенным поселениям. На основании этих данных автор предположил, что сурки редко селились в поясе арчи и никогда не селились ниже этого пояса. Основным их местом обитания являлись сравнительно влажные травянистые лужайки выше арчевых массивов. Здесь они поселились повсюду. Наклон площадки и экспозиция склона не играла никакой роли. Больше значение имел характер поверхности – сурки предпочитали площадки с мягкой почвой и не селились в голых скалах (Мекленбурцев, 1934).

В летописи природы Заповедника Аксу-Джабаглы 1926–1951 гг. отмечается: «Длиннохвостый сурок на территории заповедника обычен и распространен преимущественно на субальпийских лугах и лугово-степных нагорьях в бассейне р. Аксу и малого Балдабрека в западной части заповедника». В 1943 г. был проведен учет длиннохвостых сурков в бассейне р. Джабаглы, по северным склонам Алатау, к юго-востоку от долины р. Талды-Булак. Общее число сурков в пересчете на всю территорию было определено сотрудником П.А.Янушко в 450 голов. Отчет П.А.Янушко о работе за 1943 г. «Разработка методики учета сибирского козерога и длиннохвостого сурка» состоит из 38 страниц мелкого рукописного текста, иллюстрирован картами с указанием мест обитания поселений красного сурка и картой мест обитания *Capra sibirica* в летнее время и 30-ю рисунками отдельных участков.

В 1950 г. в этом же районе лаборант П.А.Янушко повторил учет сурков тем же методом (подсчетом животных, выходящих из нор на кормежку) и получил численность в этих районах 709 голов.

В начале 60-х XX ст. были проведены повторные исследования в этом районе. Было установлено, что длиннохвостый сурок является обычным видом горной фауны Западного Тянь-Шаня. В заповеднике распространен по всей территории в альпийском и субальпийском поясах. Местами заходит в нижележащие арчовый пояс, а в последние годы – даже в лугостепной пояс.



Рис. 3. Естественные места обитания сурка

Колонии (поселения) сурков располагаются как на открытых местах с низкой альпийской растительностью, так и в непосредственном соседстве с участками кустарников или крупных камней. На территории заповедника колонии сурка расположены неравномерно и подвержены многолетней динамике. В каждом поселении обитает от 2 до 55 зверьков, находятся поселения на значительном расстоянии друг от друга, часто в 10–15 км. Авторы пришли к выводу, что на 6/7 частях территории заповедника учтено 360 голов, из них 312 взрослых и 48 молодых зверьков; на всей территории, следовательно, примерно будет 420 особей (Ковшарь, Янушко, 1965).

Исследования были возобновлены в начале XXI ст. Наряду с постоянными местами обитания сурка, известными с 1940-х годов: в верховьях Топшак-сазы, верховьях Жабаглы, в долине ущелья Чуулдак, у подножия Сайрамского пика (Янушко, 1943), известны места, где колонии сурка полностью исчезли. Так, в последнее десятилетие исчезли сурки в верховье реки Кши-Аксу, на перевале Казан-Чукур. Некоторые исследователи считают причиной этого разрастание травянистой растительности в заповеднике (Шукуров и др., 2005). Однако, по другим данным (Бибииков, 1989; Шакула и др., 2007), напротив, красный сурок часто выбирает для своих поселений заросли кустарников и высоких трав.



Рис. 4. Поселения сурков сосредоточены исключительно на высокогорных жайляу в поясе альпийских степей и верхней субальпики, на высоте 2000–3000 метров над ур. м. и приурочены к ручьям, выходам грунтовых вод и снежникам, где зверьки в течение сезона обеспечены травянистым сочным кормом

Так, в 2005 году выявлена новая молодая колония сурков в ущелье недалеко от кордона Талдыбулак (Шакула и др., 2007). Это самая низко расположенная колония из когда-либо отмеченных на территории Аксу-Жабаглинского заповедника. Здесь, на высоте 1442 м над ур. м. на склоне северо-восточной экспозиции крутизной в 20° в 2,5 км от села Жабаглы среди густой травянисто-кустарниковой растительности отмечена семья сурков, в которой зарегистрировано три взрослые особи. Координаты колонии – 42°24,605' с. ш. и 70°29,292' в. д. Еще одна новая колония обнаружена в 2007 г. в урочище Курусай на высоте 1607 м над ур. м. на склоне северо-западной экспозиции крутизной в 30°. Встречено 4 сурка.

Новая колония сурков также зарегистрирована в 2006 г. в ущелье Улькен-Каинды на высоте 1844 м над ур. м. Всего в колонии живет три семьи сурков, зарегистрировано 8 особей. Она расположена на местности уклоном 3–5°, экспозиция северо-восточная. Координаты: 42°23,923' с. ш. и 70°37,141' в. д. Сурки заселили участок, заваленный строительными бетонными блоками, которые были завезены на территорию ООПТ для строительства гостиницы для туристов в 1990 г., а затем брошены.

Таблиця 1.

Сведения о численности и местонахождении колоний сурков популяции, расположенной на территории Аксу-Джабаглинского государственного природного заповедника

Год	Число особей и местонахождение колоний	Источник
1934	«Еще недавно, два-три года назад, сурки громадными колониями населяли все подходящие места в долинах заповедника. Теперь же, пройдя всю долину Джабаглы и большую часть Кы-Аксу, я смог увидеть всего лишь 16 сурков и сотни пустых нор. Нужно отметить, что и эти остатки уцелели там, куда затруднен доступ, в самых глухих уголках. Сурки страшно пугливы».	Меклен-бурцев, 1934
1942–1943	«В 1943 году в заповеднике Аксу-Джабаглы учет сурков проведен примерно на площади в 60000 га. Не удалось провести учет сурков на площади в 10000 га, т.к. работа эта очень трудоемка, а в глубинной, труднодоступной части заповедника пришлось быть в некоторых местах в конце августа, когда сурки уже залегают в спячку. Всего учтено 360 сурков. Если примем, что и на необследованной территории плотность сурков такая же, как и на обследованной, и учтем то обстоятельство, что в глубинной части заповедника сурки учитывались в некоторых местах в конце августа, когда они начинают залегать в спячку, то общее количество сурков, имеющееся в заповеднике, будет равно минимум 420–450 голов ».	Янушко, 1943
1950	В 1950 г. в этом же районе лаборант П.А.Янушко повторил учет сурков тем же методом (подсчетом животных, выходящих из нор на кормежку) и получил численность в этих районах 709 голов .	Летопись природы Заповедника Аксу-Джабаглы, 1926–1951 гг.
1965	«В заповеднике распространен по всей территории в альпийском и субальпийском поясах. Местами заходит в нижележащие арчовый пояс, а в последние годы – даже в лугостепной пояс. Колонии (поселения) сурков располагаются как на открытых местах с низкой альпийской растительностью, так и в непосредственном соседстве с участками кустарников или крупных камней. Сурки устраивают жилые норы на сухих склонах или площадках, часто под крупными камнями; иногда под кустами арчи или других кустарников. На территории заповедника колонии сурка расположены неравномерно и подвержены многолетней динамике. В каждом поселении обитает от 2 до 55 зверьков, находятся поселения на значительном расстоянии друг от друга, часто в 10–15 км». Авторы пришли к выводу, что на 6/7 частях территории заповедника учтено 360 голов, из них 312 взрослых и 48 молодых зверьков; на всей территории, будет 420 особей .	Ковшарь, Янушко, 1965
2007	Используя общепринятые методы расчета численности сурков на учетной площади и экстраполируя данные учетов на всю заповедную территорию, авторы оценили численность всей популяции длиннохвостого сурка в Аксу-Жабаглинском заповеднике в 900–1000 особей .	Шакула и др., 2007

Первый картографический материал мы находим в рукописи П.А.Янушко (рис. 5).

Колония в верховьях Сарыайгыра интересна тем, что является крайней юго-западной точкой в ареале аксу-жабаглинской популяции длиннохвостого сурка. По реке Сарыайгыр проходит граница ареалов двух видов сурков: по правому берегу – поселения длиннохвостого сурка, по левому – сурка

Мензбира. В этой колонии было отмечено 4 взрослых сурка, расположена она на правом берегу реки Сарыайгыр на высоте 2639 м над ур. м. на склоне западной экспозиции крутизной 42°, координаты колонии 42°04,563' с. ш. и 70°20,660' в. д. (Шакула и др., 2007).

Во время проведения учетных и полевых работ в ранее известных местах обитания длиннохвостых сурков (П.А.Янушко, всего было учтено 225 особей на площади 27 200 га). Шакула и др. (2007) определили плотность населения в наиболее благоприятных местах обитания в 8 особ./1000 га, в менее заселенных сурком участках – в 0,5 особи на 1000 га. Также авторы отмечали участки, где поселения сурка отсутствуют. Используя общепринятые методы расчета численности сурков на учетной площади и экстраполируя данные учетов на всю заповедную территорию, авторы оценили современную численность всей популяции длиннохвостого сурка в Аксу-Жабаглинском заповеднике в 900–1000 особей (Шакула и др., 2007).

Недостатком всех этих исследований была методика учета численности, в частности визуальный метод учета сурков в колониях. Основным критерий учета в первую очередь должен уделяться семейным участкам. Это более постоянная величина.

Основной задачей нашего исследования было определение современного состояния популяции длиннохвостого сурка в Топшак-сазы в Аксу-Жабаглинском заповеднике. Первые сведения о наличии поселений сурков на территории представлены в табл. 1.



Рис. 5. Оригинальный рисунок П.А.Янушко. Распространение красного сурка на территории заповедника Аксу-Джабаглы в 1943 г. (Янушко, 1943)

Как уже отмечалось, наши работы проводились в верховьях р. Топшак. В 1943 г. в этом поселении автор отмечал только 3 поселения, расположенные друг от друга на расстоянии 200–300 м (рис. 3, 5; табл. 2).

Долина р. Топшак. Имеется три поселения сурков. «Поселения №№ 1, 36, 37 находятся у истока р. Топшак. Ехать можно в урочище Топшак-сад, куда идет хорошая тропа, от кордона Джабагалы... На восток от урочища Топшак-сада находится верховье Карасая. Проехав озерцо и болото, будете спускаться вниз по болотистому лугу и перед подъемом на гору будете переезжать ручей, текущий с юга на север – это и есть верховье р. Топшак. На склоне правого берега и находится три

поселения сурков, одно влево от тропы (по направлению движения) в нижней части склона, другое вправо от тропы, также в нижней части склона, а третье выше – налево от тропы, не доезжая несколько десятков метров до солонца. Все эти поселения сурков находятся недалеко друг от друга на расстоянии, не превышающем 200–300 метров» (рис. 6). В настоящее время эти семейные участки существуют. Колония увеличила свою численность в десятки раз.

Таблица 2.
 Количество учтенных сурков в заповеднике Аксу-Джабаглы в 1943 году (Янушко, 1943)

№	Долины рек	Названия саев, урочищ и речек	Количество сурков			Примечания
			всего	взрослых	молодых	
1	Бала-Балдабрек	ур. Коль-Джайляу	6	4	2	
2	-//-	сай, впад. в Кыт-Читбулак	3	3	-	
3	-//-	верх. р. Лаккеты	8	8	-	
4	-//-	верх. р. Курусай	19	11	8	
5	-//-	верх. р. Улькун-Чигыбулак	26	19	7	
6	-//-	верх. р. Саркрата	6	5	1	В 1942 г. было 5 взр. сурков
7	Балдабрек	ур. Коль-Джайляу	24	19	5	
8	-//-	ур. Коржун-Тор	20	18	2	
9	-//-	ур. Шунгульдук	55	48	7	
10	Аксу	ур. Джеты-Тор	27	25	2	
11	-//-	ур. Коль-Ольды	39	38	1	
12	-//-	ур. Чукур-Тор	1	1	-	
13	-//-	верх. р. Кыт-Аксу	19	17	2	
14	-//-	ур. Сад-Кора	-	-	-	В 1942 г. было 3 взр. сурка
15	-//-	ур. Джеты-Тыд	2	2	-	
16	-//-	Карасай (Менджинки)	7	6	1	Данные учета 1942 г.
17	-//-	Терек-Сай	7	6	1	
18	-//-	верх. Куруксая	6	6	-	
19	Ирсу	верх. р. Ирсу	42	36	6	
20	Джабаглы	верх. Иргалы-сая	5	5	-	
21	-//-	ур. Аут	4	4	-	В 1942 г. было 5 взр. сурков
22	-//-	ур. Курусай	6	4	2	
23	Топшак	верх. р. Топшак	16	15	1	
24	Сайрамсу	ур. Садапаты	12	12	-	Данные учета 1942 г.
Итого			360	312	48	

Долина р. Джабаглы. «Находится в ур. Курусай, не доезжая Топшак-Саза. Ехать нужно от кордона Джабаглы к Топшак-Сазу по тропе, идущей по террасам левого берега Джабаглы. Переехав р. Джабаглы в ее верховье (недалеко от ледника), будете подниматься по склону правого берега Джабаглы с большим количеством сухой арчи. Тропа поднимается на гребень. На север, а поднявшись (от старого пограничного столба), поворачивает на восток и идет по долине Курусая вниз по склону его левого берега. С левой стороны (по направлению движения) проходят русло Курусая (небольшой ручеек) и склоны южной экспозиции хребта Джабаглы, а справа будет расстилаться обширная площадка с легким уклоном на северо-запад. Когда тропа со склона перейдет на русло ручья (впадающего в Курусай, обычно сухого), за которым начинается указанная выше площадка, то сурков ищите слева на склоне хр. Джабаглы, по правому берегу Курусая. Поселение хорошо видно с тропы, когда спускаетесь по склону Курусая. Сурки имеются в

двух местах: одно хорошо заметно по сурчинам на склоне, а другое далее на восток у устья сая, впадающего в Курусай с севера». В настоящее время на этой территории мы учли 6 семейных участков (186, 187, 188, б/н, 197, б/н.).

Нижней колонии, по пути вниз к кордону Топшак, П.А.Янушко не отмечал. Скорее всего в то время это поселение не существовало. Здесь мы учли 6 семейных участков (207, 208, 209, 211, 212).

Как видим из результатов наблюдений 2014 г., отраженных в табл. 3, в размножении участвовало 10% семей. Среднее число сеголеток в семьях, участвовавших в размножении, – 0,3. Среднее число сурков в семье составляет 3,2, что значительно ниже данных других исследователей. Настораживает низкий процент сеголеток. Но мы должны отметить то, что это поселение постоянно контролирует стая волков, и вполне возможно, что большая часть молодняка была ими уничтожена до нашего приезда.

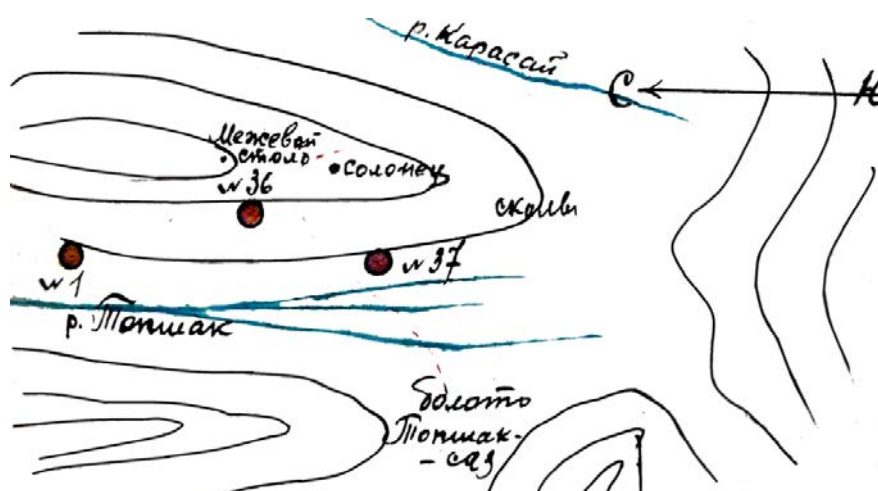


Рис. 6. В 1943 г. на р. Топшак П.А.Янушко отмечал только 3 поселения, расположенные друг от друга на расстоянии 200–300 м

Таблица 3.

Число особей в семьях красного сурка в 2014 г. на территории заповедника Аксу-Джабаглы

№№ семей	Число особей		
	взрослых	сеголеток	всего
1	3		3
2	4		4
3	3		3
4	2		2
5	2	3	5
6	3		3
7	2		2
8	3		3
9	3		3
10	4		4
Среднее	2,9	0,3	3,2

К настоящему времени ареал сурков принял пятнистый характер с мозаичным и ленточным типом поселений. На площади 1800 га обитает 102 семьи (приблизительно 320–330 особей).

Заселенные участки площадью 0,5 до 2 км² относительно изолированы друг от друга с плотностью 0,06 сем./га. Таким образом, 22700 особей красного сурка мы считаем реальным числом на территории Аксу-Жабаглинского заповедника. Это число характеризует ядро казахстанской

популяції. Исследовать более подробно современное состояние отдельных колоний и точно очертить границы ареала, дать более детальную картину распространения и численности этого вида – задача дальнейших исследований.

Благодарности

Выражаем благодарность А.А.Атемасову за обработку картографических материалов и НПО «Дикая природа» за предоставленные архивные материалы.

Список литературы

- Айзин Б.М. Современное состояние сурков в Киргизии // Охрана, рациональное использование и экология сурков: Матер. Всесоюз. совещ. – М., 1983. – С. 9–12. /Ayzin B.M. Sovremennoye sostoyaniye surkov v Kirgizii // Okhrana, ratsional'noye ispol'zovaniye i ekologiya surkov: Mater. Vsesoyuz. soveshch. –M., 1983. – С. 9–12./
- Бибиков Д.И. Сурки. – М.: Агропромиздат, 1989. – 254с. /Bibikov D.I. Surki. – M.: Agropromizdat, 1989. – 254s./
- Бибиков Д.И., Стогов И.И. Экологические закономерности стациального размещения серых сурков в Тянь-Шане // Бюлл. МОИП. Отд. биол. – 1957. – Т.62, вып.2. – С. 13–18. /Bibikov D.I., Stogov I.I. Ekologicheskiye zakonomernosti statsial'nogo razmeshcheniya serykh surkov v Tyan'-Shane // Byull. MOIP. Otd. biol. – 1957. – T.62, vyp.2. – S. 13–18./
- Благодарова Т.В. Сравнительная экология сурков Киргизии // Тр. Биологического ин-та Кир. ФАН СССР. – 1947. – Вып.2. – С. 107–119. /Blagodarova T.V. Sravnitel'naya ekologiya surkov Kirgizii // Tr. Biologicheskogo in-ta Kir. FAN SSSR. – 1947. – Vyp.2. – S. 107–119./
- Давыдов Г.С. О стациальном размещении красного сурка в Таджикистане // Ресурсы фауны сурков в СССР. – М.: Наука, 1967. – С. 33–34. /Davydov G.S. O statsial'nom razmeshchenii krasnogo surka v Tadjikistane // Resursy fauny surkov v SSSR. – M.: Nauka, 1967. – S. 33–34./
- Ковшарь А.Ф., Янушко П.А. Новые данные о млекопитающих заповедника Аксу-Джабаглы // Труды государственного заповедника Аксу-Джабаглы. – 1965. – Вып.2. – С. 230–231. /Kovshar' A.F., Yanushko P.A. Novyye dannyye o mlekopitayushchikh zapovednika Aksu-Dzhabagly // Trudy gosudarstvennogo zapovednika Aksu-Dzhabagly. – 1965. – Vyp.2. – S. 230–231./
- Ковшарь А.Ф. Государственный заповедник Аксу-Джабаглы // Исследования по ключевым орнитологическим территориям в Казахстане и Средней Азии. – Алматы, 2006. – С. 88–89. /Kovshar' A.F. Gosudarstvennyy zapovednik Aksu-Dzhabagly // Issledovaniya po klyuchevym ornitologicheskim territoriyam v Kazakhstane i Sredney Azii. – Almaty, 2006. – S. 88–89./
- Кизилев В.А., Берендяев С.А. Красный сурок // Сурки. Распространение и экология. – М.: Наука, 1978. – С. 79–125. /Kizilov V.A., Berendyayev S.A. Krasnyy surok // Surki. Rasprostraneniye i ekologiya. – M.: Nauka, 1978. – S. 79–125./
- Мекленбурцев Р.Н. Млекопитающие заповедника Аксу-Джабаглы. Рукопись. – 1934. – 32с. /Meklenburtsev R.N. Mlekopitayushchiye zapovednika Aksu-Dzhabagly. Rukopis'. – 1934. – 32s./
- Сурки. Распространение и экология / Под ред. Р.П.Зиминой. – Москва: Наука, 1978. – 224с. /Surki. Rasprostraneniye i ekologiya / Pod red. R.P.Ziminoy. – Moskva: Nauka, 1978. – 224s./
- Шакула Г.В., Шакула В.Ф., Баскакова С.В. Длиннохвостый сурок (*Marmota caudata*) в Аксу-Джабаглинском государственном заповеднике // Заповедное дело (сб. трудов РАН). – Вып.12. – Москва, 2007. – С. 33–41. /Shakula G.V., Shakula V.F., Baskakova S.V. Dlinnokhvostyy surok (*Marmota caudata*) v Aksu-Dzhabaglinskoy gosudarstvennom zapovednike // Zapovednoye delo (sb. trudov RAN). – Vyp.12. – Moskva, 2007. – S. 33–41./
- Шукуров Э., Митропольский О., Тальских В. и др. Атлас биологического разнообразия Западного Тянь-Шаня. – Астана-Бишкек-Ташкент, 2005. – С. 55–56. /Shukurov E., Mitropol'skiy O., Tal'skikh V. i dr. Atlas biologicheskogo raznoobraziya Zapadnogo Tyan'-Shanya. – Astana-Bishkek-Tashkent, 2005. – S. 55–56./
- Янушко П.А. Отчет о работе за 1943 г. «Разработка методики учета сибирского козерога и длиннохвостого сурка». Рукопись. – 1943. – Библиотека НПО «Дикая природа», с. Жаблаглы, Казахстан. – 38 с. /Yanushko P.A. Otchet o rabote za 1943 g. «Razrabotka metodiki ucheta sibirskogo kozeroga i dlinnokhvostogo surka». Rukopis'. – 1943. – Biblioteka NPO «Dikaya priroda», s. Zhabagly, Kazakhstan. – 38 s./

Представлено: **Й.В.Царик / Presented by: I.V.Tsaryk**

Рецензент: **Л.І.Воробйова / Reviewer: L.I.Vorobyova**

Подано до редакції / Received: 14.11.2015

УДК: 576.895.122

**Биоразнообразие трематод рыб трансграничного озера Джандар,
Азербайджан
Е.В.Шакаралиева**

*Азербайджанский медицинский университет (Баку, Азербайджан)
sh_yegana@rambler.ru*

В 2007–2015 годах на озере Джандар, расположенном на границе Азербайджана и Грузии, методом полного паразитологического вскрытия автором исследовано 246 экземпляров рыб, относящихся к 18 видам, обнаружен 21 вид трематод. Большинство обнаруженных видов – паразиты хрусталика глаз, кишечника и мышц, в остальных органах рыб отмечено лишь по 1 виду трематод. Все найденные виды, за исключением одного, способны паразитировать в представителях одного или нескольких семейств рыб. Видов, заражение которыми связано с поеданием донных беспозвоночных, у бентофагов зарегистрировано намного больше, чем у других рыб. В кишечнике хищников отмечены трематоды проглоченных ими рыб. Среди обнаруженных трематод 11 видов являются возбудителями заболеваний рыб, а 2 вида представляют опасность для человека.

Ключевые слова: паразиты, гельминты, озеро Джандар, трематоды, церкарии, метацеркарии, рыбы.

**Біорізноманіття трематод риб транскордонного озера Джандар,
Азербайджан
Є.В.Шакаралієва**

У 2007–2015 роках на озері Джандар, розташованому на кордоні Азербайджану та Грузії, методом повного паразитологічного розтину автором досліджено 246 екземплярів риб, що належать до 18 видів, виявлено 21 вид трематод. Більшість виявлених видів – паразити кришталика очей, кишечника і м'язів, в інших органах риб відмічено по 1 виду трематод. Всі знайдені види, за винятком одного, здатні паразитувати в представниках одного або декількох родин риб. Видів, зараження якими пов'язано з поїданням донних безхребетних, у бентофагів зареєстровано набагато більше, ніж в інших риб. У кишечнику хижаків відзначені трематоди проковтнутих ними риб. Серед виявлених трематод 11 видів є збудниками захворювань риб, а 2 види становлять небезпеку для людини.

Ключові слова: паразити, гельмінти, озеро Джандар, трематоди, церкарії, метацеркарії, риби.

**Biodiversity of trematodes of the transboundary Jandar Lake fishes,
Azerbaijan
Y.V.Shakaraliyeva**

In 2007–2015 in the Jandar Lake, located on the border of Azerbaijan and Georgia, the author studied 246 specimens of fishes of 18 species by a method of complete helminthological autopsy and found 21 species of trematodes. Most of the detected species are the parasites of eye lens, intestine, and muscles; in the each of other organs of fishes 1 species was observed. All found species, with one exception, are able to parasitize in representatives of one or several families of fishes. In benthophages more than in other fishes there were found the species, which infect fish as result of eating of benthic invertebrates. In the gut of predator fishes the trematodes of swallowed by them fishes were registered. Among the all identified trematodes 11 species are pathogens of fishes, and 2 species are dangerous to human.

Key words: parasites, helminths, Jandar Lake, trematodes, cercariae, metacercariae, fish.

Введение

Озеро Джандар, образованное в результате разливов реки Куры в естественной впадине, расположено на высоте 288,5 м над уровнем моря на границе Азербайджана (в 35 км к северо-западу от г. Акстафа) и Грузии (в 40 километрах к юго-востоку от г. Тбилиси). Его площадь 1250 га, из которых 60% относятся к Азербайджану, а 40% – к Грузии. Вода поступает сюда по каналам из рек Куры и Иори, Тбилисского водохранилища.

Климат местности, окружающей озеро, сухой умеренно жаркий, температура воды в течение года колеблется от 5,4 до 29°C. Грунт песчаный, илистый и песчано-илистый, с примесью растительных остатков. В зоопланктоне отмечено 29, а в зообентосе 40 видов организмов. В высшей растительности доминирует тростник и камыш. Их заросли занимают незначительную часть площади озера. Ихтиофауна включает до 20 видов рыб, из которых вобла, красноперка, жерех, линь, подуст, храмуля, усач, шемая, лещ, сазан являются объектами промыслового и любительского лова. Озеро является важнейшим местом зимовки и остановки для отдыха в период миграций большого количества водно-болотных птиц (Султанов, 2000). Карта-схема расположения озера Джандар и пунктов сбора материала даются на рисунке, приведенном ниже.

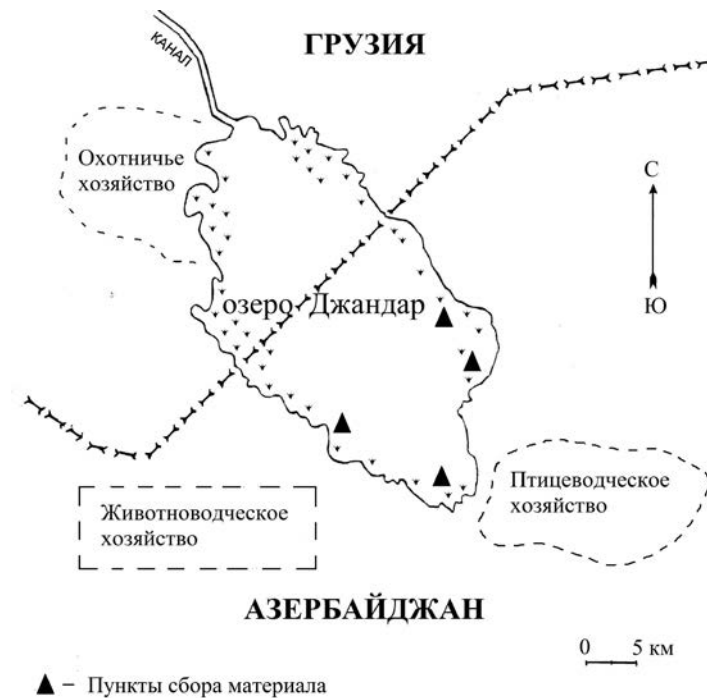


Рис. Карта-схема расположения озера Джандар и пунктов сбора материала

До проведенных нами исследований паразиты рыб этого водоема не были изучены. В связи с этим целью нашего исследования были раскрытие биоразнообразия и проведение эколого-фаунистического анализа трематод рыб озера Джандар.

Материал и методика

В различные сезоны 2007–2015 годов нами на озере Джандар методом полного гельминтологического вскрытия (Быховская-Павловская, 1985) исследовано 246 рыб, которые относятся к следующим 18 видам: красноперка – *Scardinius erythrophthalmus* (L.) – 15 экз., красногубый жерех – *Aspius aspius taeniatus* (Eichwald) – 10 экз., линь – *Tinca tinca* L. – 11 экз., куринский подуст – *Chondrostoma cyri* Kessler – 12 экз., куринский пескарь – *Gobio persa* Günther – 15 экз., куринская храмуля – *Varicorhinus capoeta* Guldenstädt – 16 экз., куринский усач – *Barbus lacerta cyri* Filippi – 15 экз., шемая – *Chalcalburnus chalcoides* (Guldenstadt) – 14 экз., куринская уклейка – *Alburnus filippi* Kessler – 17 экз., восточная быстрянка – *Alburnoides bipunctatus eicwaldi* (Filippi) – 16 экз., закавказская густера – *Blicca bjoerkna transcaucasica* Berg – 13 экз., восточный лещ – *Abramis brama orientalis* Berg – 12 экз., горчак – *Rhodeus sericeus amarus* (Bloch) – 14 экз., серебряный карась – *Carassius auratus gibelio* (Bloch, 1782) – 17 экз., сазан – *Cyprinus carpio* L. – 12 экз., закавказская щиповка – *Cobitis taenia satunini* Gladkov – 10 экз., сом – *Silurus glanis* L. – 10 экз., гамбузия – *Gambusia affinis* (Baird et Gigard) – 17 экз. Все обнаруженные трематоды были зафиксированы стандартным способом в 70° этиловом спирте и доставлены в лабораторию для дальнейшей камеральной

обработки и идентификации. Полученный материал в виде постоянных препаратов хранится на кафедре медицинской биологии и генетики Азербайджанского медицинского университета.

Результаты

В результате проведенного исследования нами был составлен таксономический обзор трематод, зарегистрированных у рыб озера Джандар, с указанием их хозяев, экстенсивности (%) и интенсивности инвазии (экз.), локализации, а также краткой биологической характеристики.

Отряд FASCIOLIDA Skrjabin et Schulz, 1937

Семейство MONORCHIDAE Oehner, 1911

Asymphylogora imitans (Müling, 1898)

Хозяева: красноперка (6,7%), густера (15,4%), лещ (33,3%), сазан (27,3%); интенсивность инвазии – 2–14 экз.

Локализация: кишечник.

Пресноводный вид, паразитирующий в кишечнике различных карповых, окуневых и бычковых рыб (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

A. tincae (Modeer, 1790)

Хозяева: линь (100,0%), жерех (20,0%), сом (30,0%); интенсивность инвазии линя – 76–620 экз., жереха и сома – 14–23 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит линя, изредка встречается и у прочих карповых, а также хищных рыб других семейства; промежуточные хозяева – моллюски *Bythynia tentaculata* и *Radix auricularia* (Комарова, 1951). Попадает в кишечник жереха и сома, которые являются хищниками, по-видимому, при заглатывании ими зараженных особей линя. В кишечнике хищников не аккумулируются, о чем свидетельствует более низкая интенсивность их заражения.

Palaeorchis incognitus Szidat, 1943

Хозяева: подуст (8,3%), густера (7,7%); интенсивность инвазии 3–8 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит карповых рыб; промежуточные хозяева – моллюски рода *Bythynia* (Вергун, 1962).

Семейство ALLOCREADIIDAE Looss, 1902

Allocreadium isoporum (Looss, 1894)

Хозяева: красноперка (13,3%), шемая (7,1%), лещ (27,2%), сом (20,0%); интенсивность инвазии мирных рыб – 1–9 экз., хищного сома – 2–4 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит различных пресноводных рыб (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

A. markewitschi Kowal, 1949

Хозяева: жерех (20,0%), пескарь (13,3%), быстрянка (12,5%), лещ (16,7%), сазан (16,7%); интенсивность инвазии – 2–8 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит карповых рыб (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

A. transversale (Rudolphi, 1802)

Хозяева: линь (18,2%), уклейка (11,8%), щиповка (20,0%), сом (30,0%); интенсивность инвазии – 2–12 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит различных рыб; первые промежуточные хозяева неизвестны, вторые промежуточные хозяева – бокоплавы рода *Gammarus* (Dawes, 1948).

Семейство ZOOGONIDAE Oehner, 1911

Phyllodistomum elongatum Nybelin, 1926

Хозяева: подуст (16,6%), карась (11,8%); интенсивность инвазии – 1–7 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит карповых рыб (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

Семейство OPECOELIDAE Ozaki, 1925

Nicolla skrjabini (Iwanitzsky, 1928)

Хозяин: сазан (16,6%); интенсивность инвазии – 1–4 экз.

Локализация: кишечник.

Паразит самых различных пресноводных рыб; первый промежуточный хозяин – моллюск *Lithoglyphus naticoides* (Тютин, Слышко, 2010), второй промежуточный хозяин – *Gammarus balcanicus* (Жохов и др., 2006).

Семейство ECHINOCHASMIDAE Odhner, 1910

Echinochasmus perfoliatus Ratz., 1908, metacer.

Хозяева: горчак (9,1%), карась (5,9%); интенсивность инвазии – 1–2 экз.

Локализация: жабры.

Метацеркарии этого паразита отмечаются в жабрах карповых рыб; первые промежуточные хозяева – моллюски *Bithynia leachi* и *Lymnaea stagnalis*, окончательные хозяева – собака, кошка, свинья, изредка человек (Сосипатров, 1964; Sahai, Srivastava, 1970).

Семейство DIPLOSTOMATIDAE Poirier, 1886

Diplostomum chromatophorum (Brown, 1931), metacer.

Хозяева: красноперка (40,0%), линь (45,5%), усач (26,7%), шемая (14,3%), быстрянка (25,0%), лещ (33,3%), гамбузия (17,6%); интенсивность инвазии – 2–94 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

Метацеркарии – паразиты хрусталиков глаз самых различных пресноводных рыб; первые промежуточные хозяева – моллюски семейства Limnaeidae, окончательные хозяева – чайковые птицы (Шигин, 1986).

D. helveticum (Dubois, 1929), metacer.

Хозяева: линь (27,3%), подуст (25,0%), храмуля (25,0%), густера (30,8%), сазан (33,3%); интенсивность инвазии – 1–12 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

В стадии метацеркария паразитирует в хрусталиках глаз различных пресноводных рыб; первые промежуточные хозяева – прудовики; definitive хозяева – чайковые птицы (Шигин, 1968).

D. mergi Dubois, 1932, metacer.

Хозяева: красноперка (26,7%), жерех (30,0%), быстрянка (6,3%), карась (17,6%); интенсивность инвазии – 3–26 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

Обитает в хрусталиках глаз различных пресноводных рыб; первые промежуточные хозяева – прудовики, окончательные – рыбоядные утки (Шигин, 1965).

D. nordmanni Shigin et Sharipov in: Shigin, 1986, metacer.

Хозяева: храмуля (12,5%), усач (20,0%), уклея (23,5%), карась (23,5%); интенсивность инвазии – 3–19 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

Метацеркарии паразитируют у различных карповых рыб; первые промежуточные хозяева – прудовики, окончательные – чайковые птицы (Судариков и др., 2002).

D. parviventosum Dubois, 1932, metacer.

Хозяева: красноперка (33,3%), линь (18,2%), уклея (17,6%); интенсивность инвазии – 2–12 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

Метацеркарии – паразиты глаз карповых рыб; первые промежуточные хозяева – прудовики, окончательные – рыбоядные птицы (Шигин и др., 1985).

D. rutili Razmashkin, 1969, metacer.

Хозяева: жерех (40,0%), быстрянка (12,5%), густера (38,5%), сазан (27,3%), гамбузия (11,8%); интенсивность инвазии – 4–53 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

Обитает в хрусталиках глаз различных пресноводных рыб; первые промежуточные хозяева – прудовики, окончательные хозяева – чайковые птицы (Шигин, 1986).

D. volvens Nordmann, 1832, metacer.

Хозяева: пескарь (26,7%), сом (20,0%); интенсивность инвазии – 1–10 экз.

Локализация: хрусталики глаз.

Паразитирует в донной части глаз различных пресноводных рыб. Цикл развития протекает с участием прудовиков и чайковых птиц (Судариков и др., 2002; Yamaguti, 1971).

Tylodelphys clavata (Nordmann, 1832), metacer.

Хозяева: жерех (20,0%), линь (9,1%), храмуля (6,3%), лещ (18,2%); интенсивность инвазии – 1–29 экз.

Локализация: стекловидное тело глаз.

Метацеркарии локализуются в стекловидном теле глаз различных пресноводных рыб, взрослые – в кишечнике голенастых и дневных хищных птиц, реже гусиных и поганок (Смогоржевская, 1976).

Hysteromorpha triloba (Rudolphi, 1819), metacer.

Хозяева: линь (27,3%), подуст (33,3%), карась (11,8%); интенсивность инвазии – 4–16 экз.

Локализация: мышцы.

Метацеркарии обитают в мускулатуре и под кожей различных пресноводных рыб, мариты – в кишечном тракте бакланов (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

Семейство POSTHODIPISTOMIDAE Surarikov, 1997

Posthodiplostomum brevicaudatum (Nordmann, 1832), metacer.

Хозяева: уклея (29,4%), сазан (8,3%); интенсивность инвазии – 1–9 экз.

Локализация: глаза, головной мозг.

Паразитирует в глазах, реже головном мозгу различных пресноводных рыб; дефинитивные хозяева – цапли (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

P. cuticola (Nordmann, 1832), metacer.

Хозяева: жерех (30,0%), усач (13,3%), густера (30,8%), лещ (16,7%), горчак (18,2%); интенсивность инвазии – 3–17 экз.

Локализация: кожа, плавники.

Метацеркарии паразитируют в коже и мускулатуре различных пресноводных рыб, партениты – в моллюсках *Planorbis planorbis*, а мариты – в кишечнике цапель (Быховская-Павловская, Кулакова, 1987).

Семейство CLINOSTOMATIDAE Lühe, 1901

Clinostomum complanatum (Rudolphi, 1819), metacer.

Хозяева: красноперка (26,7%), линь (18,2%), храмуля (18,8%), густера (15,4%), сазан (18,2%), щиповка (30,0%); интенсивность инвазии – 2–19 экз.

Локализация: мышцы, под кожей.

Метацеркарии паразитируют в мышцах, под кожей и в полости тела различных пресноводных рыб; первые промежуточные хозяева – моллюски, относящиеся к родам *Limnaea* и *Radix*, дефинитивные хозяева – цапли, пеликаны и бакланы (Быховская-Павловская, 1962).

Из приведенного выше таксономического обзора видно, что у рыб озера Джандар нами было зарегистрировано 21 вид трематод, относящихся к 1 отряду, 8 семействам и 11 родам. Из них 8 видов (представители родов *Asymphylogora*, *Palaeorchis*, *Allocreadium*, *Phyllodistomum*, *Nicolla*,) используют рыб только как окончательных хозяев, а 13 видов (представители родов *Echinochasmus*, *Diplostomum*, *Tylodelphys*, *Hysteromorpha*, *Posthodiplostomum*, *Clinostomum*) паразитируют в рыбах только на стадии метацеркария. Окончательными хозяева большинства из них являются рыбацкие птицы, причем взрослые особи *Echinochasmus perfoliatus* достигают половой зрелости также и в организме млекопитающих и человека.

В различных органах рыб обнаружено неодинаковое число видов трематод. Так, в хрусталике глаз найдено 7, кишечнике – 8, мышцах – 3, коже и плавниках – 1, жабрах – 1, стекловидном теле глаз – 1 вид трематод.

Из трематод, обнаруженных нами у рыб озера Джандар, *Asymphylogora tincae* является специфичным паразитом линя; 6 видов (*Palaeorchis incognitus*, *Allocreadium markewitschi*, *Phyllodistomum elongatum*, *Echinochasmus perfoliatus*, *Diplostomum nordmanni*, *D. parviventosum*) характерны для карповых, а 14 видов (*Asymphylogora imitans*, *Allocreadium isoporum*, *A. transversale*, *Nicolla skrjabini*, *Diplostomum chromatophorum*, *D. helveticum*, *D. mergi*, *D. rutili*, *D. volvens*, *Tylodelphys clavata*, *Hysteromorpha triloba*, *Posthodiplostomum brevicaudatum*, *P. cuticola*, *Clinostomum complanatum*) – для представителей различных семейств пресноводных рыб.

У различных видов рыб было отмечено следующее число видов трематод: у линя – 8, сазана – 7, красноперки, жереха и густеры – по 6, леща – 5, подуста, храмули, уклеи, быстрянки и карася – по 4, усача и сома – по 3, щиповки, пескаря, шемаи, горчака и гамбузии – по 2.

Прослежена зависимость зараженности исследованных рыб трематодами от их питания и образа жизни. Так, у бентофагов, к которым относятся линь, подуст, пескарь, усач, быстрянка, густера, лещ, сазан, щиповка и гамбузия, отмечены все 8 видов, попадающих в организм рыб при поедании донных беспозвоночных. У шемаи, уклеи и карася, которые питаются преимущественно зоопланктоном, отмечено 3 таких вида (*Allocreadium isoporum*, *A. transversale* и *Phyllodistomum elongatum*), у красноперки и горчака, поедающих преимущественно растения, – только 1 такой вид (*Allocreadium isoporum*), а у храмули, основу питания которой составляет детрит, подобных видов не найдено. Интересно, что виды, заражение которыми связано с поеданием донных беспозвоночных,

найдені також у жереха і сома, які годяться рибою, однак у них екстенсивність і інтенсивність інвазії цими видами була нижче, ніж у бентофагов. Як уже відзначалося, зараженість хищних жереха і сома трематодою *Asymphylogora tincae*, по-видимому, пов'язано з поеданням линя, сильно інвазованого цим паразитом. Можна передположити, що часті гельмінтів, що належать до видів *Allocreadium isoporum* і *A. transversal*, потрапляють в кишечник сома таким же способом.

Зараження риб трематодами, церкарії яких активно проникають в організм риб і перетворюються там в метацеркариєв, передбачає просторову близькість останніх до місця обитання моллюсків – перших проміжних господарів трематод. Тому такими паразитами сильніше заражаються бентофаги і фітофаги, що живуть у дні і в заростях водної рослинності. У таких риб констатовані метацеркарії 13 видів трематод. З решти риб у хищних жереха і сома знайдені по 5, а у детритофага храмулі 4 види трематод, церкарії яких активно проникають в риб.

Серед виявлених нами трематод *Diplostomum chromatophorum*, *D. helveticum*, *D. mergi*, *D. nordmanni*, *D. parviventosum*, *D. rutili*, *D. volvens*, *Tylodelphys clavata*, *Hysteromorpha triloba*, *Posthodiplostomum brevicaudatum* і *P. cuticola* є збудителями захворювань риб (Головіна і др., 2003; Ібрагімов, 2012). *Echinochasmus perfoliatus* і *Clinostomum complanatum*, потрапляючи в організм людини з сирими або не підданими достаточній термічній обробці рибними продуктами, становлять небезпеку для його здоров'я (Тахмазлі, 200; Yamashita, 1938). Церкарії всіх перерахованих тут видів при соприкосновенні з поверхнею тіла людини проникають в шкіру і викликають дерматит (Судариков, Васильєв, 1983).

Заключення

Паразитологічними дослідженнями, проведеними нами в 2007–2015 роках, у риб озера Джандар виявлено 21 вид трематод, з яких 8 видів використовують риб тільки як остаточних господарів, а 13 видів паразитують в рибах тільки на стадії метацеркарія. В хрусталику очей риб знайдено 7, кишечнику – 8, м'язах – 3; в кожному з решти органів і тканин – по 1 виду трематод.

Більшість знайдених видів має широкий круг господарів, охоплюючи представників одного або декількох родин риб, тільки 1 вид проявляє видову специфічність.

Видів, зараження якими пов'язано з поеданням донних беспозвоночних, у бентофагов зареєстровано набагато більше, ніж у інших риб. В кишечнику хищників відзначені трематоди проглочені ними рибами. Риби, що живуть в заростях водної рослинності і у дні, будучи просторово близькі до моллюсків – перших проміжних господарів трематод, сильніше заражені метацеркаріями трематод, церкарії яких активно проникають в риб.

Серед виявлених трематод 11 видів є збудителями захворювань риб, а 2 види (*Echinochasmus perfoliatus* і *Clinostomum complanatum*) становлять небезпеку для людини.

Список літератури

- Быховская-Павловская И.Е. Трематоды птиц фауны СССР (эколого-географический обзор). – М.-Л.: Изд. АН СССР, 1962. – 407с. /Bykhovskaya-Pavlovskaya I.Ye. Trematody ptits fauny SSSR (ekologo-geograficheskiy obzor). – М.-Л.: Izd. AN SSSR, 1962. – 407s./
- Быховская-Павловская И.Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. – Л.: Наука, 1985. – 122с. /Bykhovskaya-Pavlovskaya I.Ye. Parazity ryb. Rukovodstvo po izucheniyu. – L.: Nauka, 1985. – 122s./
- Быховская-Павловская И.Е., Кулакова А.П. Класс Трематоды – Trematoda Rudolphi, 1808 // Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т.3. Паразитические многоклеточные (Вторая часть). – Л.: Наука, 1987. – С. 77–198. /Bykhovskaya-Pavlovskaya I.Ye., Kulakova A.P. Klass Trematody – Trematoda Rudolphi, 1808 // Opredelitel' parazitov presnovodnykh ryb fauny SSSR. T.3. Paraziticheskiye mnogokletochnyye (Vtoraya chast'). – L.: Nauka, 1987. – S. 77–198./
- Вергун Г.И. Моллюски реки Северный Донец как дополнительные хозяева трематод // Зоол. журн. – 1962. – Том XLI, вып.4. – С. 519–527. /Vergun G.I. Mollyuski reki Severnyy Donets kak dopolnitelnyye khozyayeva trematod // Zool. zhurn. – 1962. – T. XLI, vyp.4. – S. 519–527./
- Головина Н.А., Стрелков Ю.А., Воронин В.Н. Ихтиопатология. – М.: Мир, 2003. – 448с. /Golovina N.A., Strelkov Yu.A., Voronin V.N. Ikhtiopatologiya. – М.: Mir, 2003. – 448s./
- Жохов А.Э., Молодежникова Н.М., Пугачева М.Н. Распространение инвазивных трематод *Nicolla skrjabini* (Iwanitzky, 1928) and *Plagioporus skrjabini* Kowal, 1951 (Trematoda: Operecoelidae) в Волге // Российский экологический журнал. – 2006. – Вып.37 (5). – С. 363–365. /Zhokhov A.E., Molodezhnikova N.M., Pugacheva M.N. Rasprostraneniye invazivnykh trematod *Nicolla skrjabini* (Iwanitzky, 1928) i *Plagioporus skrjabini* Kowal, 1951 (Trematoda: Operecoelidae) v Volge // Rossiyskiy ekologicheskiy zhurnal. – 2006. – Vyp.37 (5). – S. 363–365./

- Ибрагимов Ш.Р. Паразиты и болезни рыб Каспийского моря (эколого-географический анализ, эпизоотологическая и эпидемиологическая оценка). – Баку: Элм, 2012. – 400с. /Ibragimov Sh.R. Parazity i bolezni ryb Kaspiyskogo morya (ekologo-geograficheskiy analiz, epizootologicheskaya i epidemiologicheskaya otsenka). – Baku: Elm, 2012. – 400s./
- Комарова М.С. К вопросу о жизненном цикле *Asymphylogora tincae* Modeer // Докл. АН СССР. – 1951. – №9. – С. 69–77. /K voprosu o zhiznennom tsikle *Asymphylogora tincae* Modeer // Dokl. AN SSSR. – 1951. – No9. – S. 69–77./
- Смогоржевская А.А. Гельминты водоплавающих и болотных птиц фауны Украины. – Киев: Наукова думка, 1976. – 416с. /Smogorzhevskaya A.A. Gel'minty vodoplavayushchikh i bolotnykh ptits fauny Ukrainy. – Kiyev: Naukova dumka, 1976. – 416s./
- Сосипатров Г.В. Жизненный цикл *Echinochasmus perfoliatus* (Ratz, 1908) // Тр. Всесоюз. Ин-та Гельминтологии. – 1964. – Т.11. – С. 151–155. /Sosipatrov G.V. Zhiznennyy tsikl *Echinochasmus perfoliatus* (Ratz, 1908) // Tr. Vsesoyuz. In-ta Gel'mintologii. – 1964. – T.11. – S. 151-155./
- Судариков В.Е., Васильев И. Семейство Diplostomatidae Poirier, 1886 // Трематоиды птиц причерноморских и прикаспийских районов. – М., 1983. – С. 43–62. /Sudarikov V.Ye., Vasil'yev I. Diplostomatidae Poirier, 1886 // Trematody ptits prichernomorskikh i prikaspiyskikh rayonov. – M., 1983. – S. 43–62./
- Судариков В.Е., Шигин А.А., Курочкин Ю.А. и др. Метацеркарии трематод – паразиты рыб пресноводных гидробионтов Центральной России. – М.: Наука, 2002. – 298с. /Sudarikov V.Ye., Shigin A.A., Kurochkin Yu.A. i dr. Metatserkarii trematod – parazity ryb presnovodnykh gidrobiontov Tsentral'noy Rossii. – M.: Nauka, 2002. – 298s./
- Султанов Э.Г. Кызылагачский заповедник // Потенциальные Рамсарские угодья (водно-болотные угодья международного значения) Азербайджана. – Баку: Wetlands International Publication, 2000. – С. 84–87. /Sultanov E.G. Kyzylagachskiy zapovednik. Potentsial'nyye Ramsarskiye ugod'ya (vodno-bolotnyye ugod'ya mezhdunarodnogo znacheniya) Azerbaydzhana. – Baku: Wetlands International Publication, 2000. – S. 84–87./
- Тахмазли Г.И. Эпидемиологическая эффективность организации и осуществления санитарно-паразитологического контроля за пищевыми продуктами. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / 2429.01 – паразитология. – Баку, 2003. – 28с. /Takhmazli G.I. Epidemiologicheskaya effektivnost' organizatsii i osushchestvleniya sanitarno-parazitologicheskogo kontrolya za pishchevymi produktami. Avtoref. diss. ... kand. biol. Nauk / 2429.01 – parazitologiya. – Baku, 2003. – 28s./
- Тютин А.В., Слышко Ю.В. Первая находка черноморского моллюска *Lithoglyphus naticoides* (Gastropoda) и связанных с ним видов специфичных трематод в бассейне Верхней Волги // Российский журнал биологических инвазий. – 2010. – Вып.1 (1). – С. 45–49. /Tyutin A.V., Slyshko Yu.V. Pervaya nakhodka mollyuska *Lithoglyphus naticoides* (Gastropoda) i svyazannykh s nim spetsifichnykh trematod v basseyne Verkhey Volgi // Rossiyskiy zhurnal biologicheskikh invaziy. – 2010. – Vyp.1 (1). – S. 45–49./
- Шигин А.А. К изучению жизненного цикла *Diplostomum mergi* (Trematoda, Diplostomatidae) – нового возбудителя диплостомоза рыб // Тр. ГЕЛАН СССР. – 1965. – Т.15. – С. 203–205. /Shigin A.A. K izucheniyu zhiznennogo tsikla *Diplostomum mergi* (Trematoda, Diplostomatidae) – novogo vozбудitelya diplostomoza ryb // Tr. GELAN SSSR. – 1965. – T.15. – S. 203–205./
- Шигин А.А. Систематический обзор метацеркариев рода *Diplostomum* – паразитов рыб Волги и Рыбинского водохранилища // Тр. Астраханского заповедника. – 1968. – Т.11. – С. 275–324. /Shigin A.A. Sistematischeskiy obzor metatserkariyev roda *Diplostomum* – parazitov ryb Volgi i Rybinskogo vodokhranilishcha // Tr. Astrakhanskogo zapovednika. – 1968. – T. 11. – S. 275–324./
- Шигин А.А. Трематоиды фауны СССР. Род *Diplostomum*. Метацеркарии. – М.: Наука, 1986. – 253с. /Shigin A.A. Trematody fauny SSSR. Rod *Diplostomum*. Metatserkarii. – M.: Nauka, 1986. – 253 s./
- Шигин А.А., Чупилко С.В., Клочкова Е.А. Изучение жизненного цикла *Diplostomum parviventosum* (Trematoda, Diplostomidae) – паразита рыбадных птиц // Тр. ГЕЛАН СССР. – 1985. – Т.33. – С. 159–180. /Shigin A.A., Chupilko S.V., Klochkova Ye.A. Izucheniye zhiznennogo tsikla *Diplostomum parviventosum* (Trematoda, Diplostomidae) – parazita ryboyadnykh ptitz // Tr. GELAN SSSR. – 1985. – T.33. – S. 159–180./
- Dawes B. The trematoda: with special reference to British and other European forms. – Cambridge Univ. Press, 1948. – 644p.
- Sahai B.N., Srivastava H.D. Studies on *Echinochasmus perfoliatus* (Ratz, 1908) Dietz, 1909: incidence in dogs and development of the miracidium // J. Helminthol. – 1970. – Vol.44 (3). – P. 315–330.
- Yamaguti S. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. – Tokyo, 1971. – 1800p.
- Yamashita J. *Clinostomum complanatum*, a trematode parasite new to man // Annot. Zool. Japan. – 1938. – Vol.17 (3–4). – P. 563–566.

Представлено: Ш.Р.Ибрагимов / Presented by: Sh.R.Ibragimov
Рецензент: А.Ю.Утевський / A.Yu.Utevsky
Подано до редакції / Received: 17.12.2015

УДК: 598. 574.472

Орнітофауна заказника общегосударственного значения «Лучковский» Т.В.Шупова¹, А.Б.Чаплыгина²

¹Институт эволюционной экологии НАН Украины (Киев, Украина)
tv.raksha@gmail.com

²Харьковский национальный педагогический университет имени Г.С.Сковороды (Харьков, Украина)
iturdus@ukr.net

Дан анализ разнообразия орнітофауны заказника общегосударственного значения «Лучковский», распределения птиц по его биотопам, изменений, произошедших в сообществах птиц с момента организации заказника (1996 г.) к нынешнему времени. В гнездовой период отмечено 112 видов птиц, 88 из которых гнездятся. Средняя плотность гнездования птиц составляет $1,2 \pm 0,17$ пар/км². В ландшафтно-генетической структуре преобладает группа неморальных (17), древнеморальных (12) и лесостепных (12) видов, а в экологической – дендрофилы (46 видов). Наиболее массовыми являются зяблик ($P_i=0,09$), золотистая щурка ($P_i=0,06$), черный дрозд ($P_i=0,05$). Видовое богатство птиц степных биотопов характеризуется наиболее низкими значениями индексов разнообразия, а луговых – наиболее высокими. Установлено сходство сообществ гнездящихся птиц степных и лесных биотопов: 38 общих видов, коэффициент Жаккара – 0,6, Серенсена – 0,8. Рекреационная нагрузка в заказнике является умеренной, на что указывает обилие кампофилов (27,8%) и птиц приземно-кустарникового яруса (19,3%).

Ключевые слова: орнітофауна, видовое разнообразие, биотопическое распределение, экологическая и ландшафтно-генетическая структура сообщества.

Орнітофауна заказника загальнодержавного значення «Лучківський» Т.В.Шупова, А.Б.Чаплыгина

Наданий аналіз різноманіття орнітофауны заказника загальнодержавного значення «Лучківський», розподілу птахів за біотопами, змін в угрупованнях птахів, які відбулись за час роботи заказника (з 1996 р.). У гніздовий період відмічено 112 видів птахів, з яких 88 гніздяться. Середня щільність гніздування птахів складає $1,2 \pm 0,17$ пар/км². У ландшафтно-генетичній структурі переважає група неморальних (17), древнеморальних (12) та лісостепових (12) видів, а в екологічній – дендрофіли (46 видів). Найбільш чисельні в заказнику: зяблик ($P_i=0,09$), бджолоїдка ($P_i=0,06$), чорний дрізд ($P_i=0,05$). Найбільш низькі показники індексів видового багатства птахів відмічено для степових біотопів заказнику, найбільш високі – для лучних. Встановлено схожість угруповань птахів, що гніздяться у степових та лісових біотопах: 38 спільних видів, коефіцієнт Жакара – 0,6, Серенсена – 0,8. Рекреаційне навантаження у заказнику є помірним, на що вказує частка кампофілів (27,8%) та птахів приземно-чагарникового ярусу (19,3%).

Ключові слова: орнітофауна, біотопічний розподіл, видове різноманіття, екологічна та ландшафтно-генетична структура угруповання.

The avifauna of the reserve of national importance "Luchkivskiy" T.V.Shupova, A.B.Chaplygina

Diversity of avifauna in the reserve of national importance "Luchkivskiy", distribution of birds in its biotopes and changes occurred in the communities of birds since 1996 were analyzed. In the nesting period there have been observed 112 species of birds, 88 of which nest. The average density of nesting birds is 1.2 ± 0.17 pairs/km². Dendrofiles (46 species) dominate in ecological structure. Nemoral (17), ancient nemoral (12) and forest-steppe (12) species dominate in the landscape genetic structure. The most numerous are *Fringilla coelebs* ($P_i=0.09$), *Merops apiaster* ($P_i=0.06$), *Turdus merula* ($P_i=0.05$). Species diversity of birds in steppe habitat is low, in meadow is the highest. The communities of nesting birds in steppe and forest habitats are similar: 38 common species, Jaccard index is 0.6, Sorensen – 0.8. Recreational load in the reserve is mild. This explains the abundance of birds nesting on the ground (27.8%) and in shrub layer (19.3%).

Key words: avifauna, biotopical distribution, species diversity, ecological and landscape genetic structure of the community.

Введение

Стремительные темпы трансформации ландшафтов вызывают экологическую

дестабилизированность среды существования организмов, вытеснение животных в несвойственные им биотопы, обитание в условиях измененного гидрологического и геохимического режимов. Перестройки природных комплексов приводят к нарушению связей между их элементами и элиминации видов. Как следствие, это приводит к общей деградации экосистем (Бельский, 2010). Птицы играют существенную роль в природных сообществах и чутко реагируют на все изменения в них (Кузьменко, 2000; Сенник, 2008). Наблюдаемые тенденции использования человеком природной среды указывают на то, что трансформация ландшафтов и антрополическая нагрузка на них в дальнейшем будут прогрессировать. В какой-то мере расширение масштабов воздействия человека на среду обитания стимулирует некоторые виды птиц к синантропизации. Но в большей степени результатом чрезмерного антрополического пресса часто является вытеснение еще не адаптировавшихся к соседству человека аборигенных видов птиц. В результате снижается биотическое разнообразие, разрушаются консортивные связи в сообществах, нарушается сбалансированное функционирование экосистем.

Препятствовать процессам трансформации возможно путем организации природных резерватов на основе всестороннего знания закономерностей строения и функционирования биологических систем. При этом мониторинг орнитофауны является одним из определяющих элементов природоохранной деятельности. Целью нашей работы являлась оценка разнообразия орнитофауны заказника общегосударственного значения «Лучковский» (Украина), анализ распределения птиц в различных биотопах и изменений, произошедших с момента организации заказника к нынешнему времени.

Материал и методы

Материалы собраны в мае-июне 1996 и 2014 гг. в заказнике общегосударственного значения «Лучковский», который расположен на границе лесостепной и степной зон. Нами обследованы байрачные леса на правом берегу реки Ворсклы (4 км²), в комплексе с участками степного разнотравья (1,5 км²), луга в пойме реки (4,5 км²) и территория управления заказником (0,4 км²). Всего исследованиями охвачено около 10 км². Видовой состав, территориальное распределение и плотность гнездования орнитофауны определяли методом учетов численности птиц на маршрутах (Новиков, 1953).

Заказник общегосударственного значения «Лучковский» был организован в 1996 г. Расположен он в Кобелякском районе Полтавской области в нижнем течении р. Ворсклы между селами Лучки и Ольховатка. Площадь заказника 16,20 км² охватывает долину и пойму реки Ворсклы и ее террасы. Сейчас он является составной частью регионального ландшафтного парка «Нижневорсклянский». Ландшафтный парк создан для сохранения природных комплексов реки Ворсклы. Территория его привязана к северной границе степной природно-географической зоны (Национальный атлас ..., 2007).

Преобладают в заказнике луга. Показатель облесенности региона нижнего течения Ворсклы составляет около 30%. В пойме присутствуют дубравы с незначительными фрагментами осиновых и тополевых лесов. Ивовые леса приурочены к притеррасной части поймы: у подножия коренного берега р. Ворсклы. Степные биотопы фрагментарно сохранились на крутых коренных склонах правого берега и в овражно-балочных системах в комплексе с байрачными лесами (Стецюк та ін., 2002). Водоемы стационара представлены рекой Ворсклой с ее рукавами и старицами. Площадь водной поверхности занимает более 17% территории. Непосредственно к заказнику примыкают трансформированные участки, представленные селом Лучки с агроландшафтами и базой отдыха. Доля сельскохозяйственных угодий в регионе около 30%. Территорию заказника пересекает достаточно оживленная трасса Полтава–Светлогорское. Ландшафт заказника очень мозаичен. Байрачные широколиственные леса тянутся извилистой полосой вдоль берега Ворсклы шириной около 300–600 м и длиной более 10 км. Территория леса, при этом, изрезана оврагами, склоны которых представляют собой участки степного разнотравья и часто включают глинистые обрывы высотой до 20 м. Луга в пойме Ворсклы изобилуют подами, превратившимися в небольшие озерца, поросшие тростником. На луговых участках присутствуют деревья и кустарники, растущие одиночно или группами.

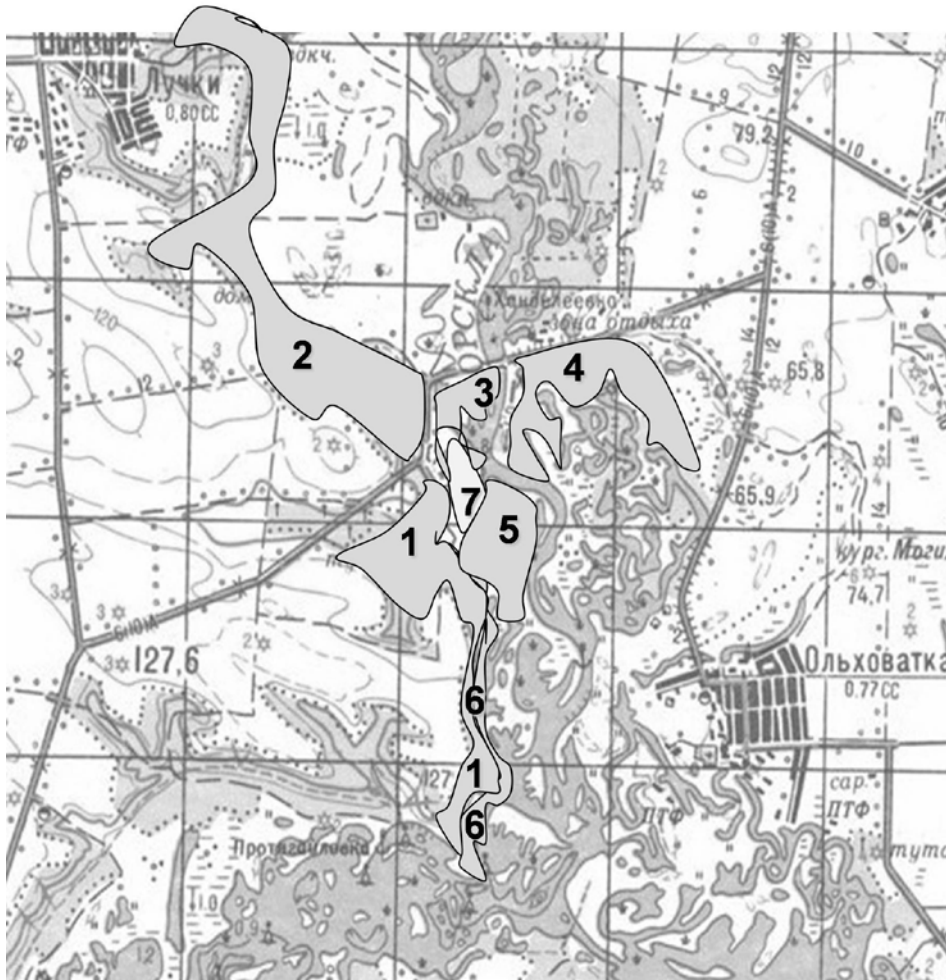


Рис. 1. Модельні ділянки заказника общегосударственного значения «Лучковський»:

- 1 – ділянка лісу №1
- 2 – ділянка лісу №2
- 3 – ділянка волого луку №1
- 4 – ділянка волого луку №2
- 5 – ділянка сухого луку
- 6 – ділянка степного різнотрав'я
- 7 – територія управління заказником

Для виявлення біотопів, підвержених загрозі порушення збалансованого розвитку їх екосистем, ми аналізували видову багатість орнітофауни. Сравнивали індекси різноманітності, домінування та рівномірності розподілу видів орнітокомплексів різних біотопів. Оскільки немає загальноприйнятої точки зору по відношенню до того, якою з індексів характеризує різноманітність краще, зазвичай використовують декілька індексів (Мэгарран, 1992). Ми застосовували наступні: Менхініка: $D_{Mn} = S/\sqrt{N}$; Маргалєфа: $D_{Mg} = (S-1)/\ln N$; Шеннона: $H' = -\sum(P_i \cdot \ln P_i)$; Бергера-Паркера: $D = N_{max}/N$; де S – кількість зустрічених на ділянці видів, N – загальна кількість відмічених на ділянці пар птахів всіх видів, N_i – кількість пар кожного виду, $P_i = N_i/N$ – відносне обилля виду. При збільшенні різноманітності спільноти, на відміну від показників інших індексів, величина індексу Бергера-Паркера зменшується. Тому його використовують як індекс, демонструючий ступінь домінування. Індекс домінування Сімпсона: $D_s = \sum(P_i \cdot (N_i - 1) / (N - 1))$, також залежить від ступеня домінування в спільноті. Для дослідження різноманітності ми використовували індекс різноманітності Сімпсона, який визначали за формулою: $c = 1/D_s$. Коефіцієнти рівномірності розподілу видів за густоти ми розраховували за індексами

Макинтоша: $E_m = (N - (\sqrt{\sum N_i^2})) / (N - N/\sqrt{S})$ и Пиелу: $E_p = H'/\lg S$.

Коэффициенты сходства между сообществами гнездящихся птиц мы рассчитывали по формулам Жаккара: $C_j = j/(a+b-j)$ и Серенсена: $C_s = 2j/(a+b)$; где j – число видов, общих для обоих сообществ гнездящихся птиц, a – число видов первого сообщества, b – число видов второго сообщества. В дополнение выполнено сравнение орнитофауны исследуемых участков с помощью кластерного анализа в программе «Origin».

Результаты и обсуждение

В гнездовой период на территории заказника «Лучковский» отмечено 112 видов птиц 16 отрядов. Гнездится здесь на сегодняшний день 88 видов 15 отрядов, которые представлены 11 ландшафтно-генетическими фаунистическими комплексами. Наибольшая доля видов относится к группам типичных неморальных (17), древненеморальных (12) и лесостепных (12) видов. Субдоминируют тропические (11) и пустынно-горные (10) виды.



Рис. 2. Ландшафтно-генетические фаунистические комплексы сообществ гнездящихся птиц заказника общегосударственного значения «Лучковский»

Орнитофауна заказника представлена 4 экологическими группировками. Преобладают дендрофилы, включающие 46 видов, значительно уступают им лимнофилы (18), кампофилы (13) и склерофилы (11). Представители последней группы предпочитают гнездиться в норах эрозийных обнажений геологических пород. Гнездовые аналоги антропогенного характера используют в основном горихвостка-чернушка, деревенская и городская ласточки, иногда воробьи. Все остальные вторичные норники используют брошенные жилища золотистых щурок или ласточек береговушек.

Средняя плотность гнездования птиц береговых биотопов заказника составляет $1,2 \pm 0,17$ пар/км². Большинство видов (21%) гнездится с плотностью около 0,1 пар/км², а около 50% списка видов имеет плотность гнездования не более 0,7 пар/км².

Наиболее плотно населен птицами участок степного разнотравья крутого склона правого берега: 196,7 пар/км². В лесных и луговых биотопах общая плотность гнездования птиц, соответственно, составила 76,0 и 93,3 пар/км².

Мозаичность ландшафта заказника приводит к смешению фаун лесных птиц и птиц открытых ландшафтов. 15 видов птиц гнездится во всех нетрансформированных биотопах. Это оказывает влияние и на распределение доминирующих в сообществах птиц.

В лесных биотопах доминирует черный дрозд (*Turdus merula* L.). Кроме того, на лесных и

степных участках в список доминантов входят: зяблик (*Fringilla coelebs* L.) и золотистая щурка (*Merops apiaster* L.), но в различном соотношении (табл. 1). Объясняется это тем, что степные биотопы, в данном регионе, существенно изрезаны оврагами и вклиниваются на территорию байрачного леса. Овраги балочной системы глубокие – более 20 м и сильно заросшие древесной растительностью: лещиной обыкновенной (*Corylus avellana* L.), бузиной черной (*Sambucus nigra* L.), боярышником (*Crataegus monogyna* Jacq.), грушей обыкновенной (*Pyrus communis* L.), терном (*Prunus spinosa* L.). Близость леса создает комфортные условия для заселения граничащих с ним территорий. Это дает возможность птицам, гнездящимся на древесной растительности, заселить практически все биотопы заказника. В целом, на долю черного дрозда, зяблика и золотистой щурки приходится около 20% птиц, гнездящихся в заказнике «Лучковский». На степных площадках список доминирующих видов дополняет ласточка-береговушка (*Riparia riparia* L.). Наличие моста, проходящего через луговой участок на берегу Ворсклы, создало условия для гнездования городской (*Delichon urbica* L.) и деревенской (*Hirundo rustica* L.) ласточек. Ласточки, в силу свойственной им социальной толерантности и возможности создавать колониальные поселения, заняли доминирующие по численности позиции среди птиц, гнездящихся на территории этого биотопа.

Таблица 1.

Птицы, доминирующие в естественных биотопах заказника «Лучковский»

Биотопы	Вид	Плотность гнездования (пар/км ²)	Относительное обилие (Pi=ni/N)
Лесные	Доминанты		
	<i>Turdus merula</i> L.	8,5	0,11
	<i>Fringilla coelebs</i> L.	7,3	0,10
	<i>Merops apiaster</i> L.	6,5	0,09
	Субдоминанты		
	<i>Riparia riparia</i> L.	3,5	0,05
	<i>Phylloscopus collybita</i> Vieillot	3,8	0,05
	<i>Parus major</i> L.	3,8	0,05
<i>Coccothraustes</i> <i>coccothraustes</i> L.	3,5	0,05	
Степные	Доминанты		
	<i>Fringilla coelebs</i> L.	26,0	0,17
	<i>Merops apiaster</i> L.	22,7	0,14
	<i>Riparia riparia</i> L.	14,0	0,09
	Субдоминанты		
	<i>Parus major</i> L.	11,3	0,07
	<i>Passer montanus</i> L.	10,7	0,07
	<i>Phylloscopus collybita</i> Vieillot	8,7	0,06
<i>Coccothraustes</i> <i>coccothraustes</i> L.	7,3	0,05	
Луговые	Доминанты		
	<i>Delichon urbica</i> L.	6,7	0,08
	<i>Hirundo rustica</i> L.	6,3	0,07
	Субдоминанты		
	<i>Luscinia luscinia</i> L.	5,0	0,06
	<i>Carduelis carduelis</i> L.	5,0	0,06
	<i>Lanius collurio</i> L.	4,0	0,05
<i>Chloris chloris</i> L.	4,3	0,05	

В целом, на территории заказника наиболее массовыми являются зяблик (Pi=0,09), золотистая щурка (Pi=0,06), черный дрозд (Pi=0,05).

Наличие в списке субдоминантов наземногнездящихся видов птиц: пеночки-теньковки (*Phylloscopus collybita* Vieillot) и соловья (*Luscinia luscinia* L.) – признак, указывающий на то, что рекреационная нагрузка на биотопы является умеренной (Соколов, Щекало, 2013) и не несет угрозы деградации экосистемам заказника. Кроме того, среди фоновых видов еще 18 наземногнездящихся составляют 20,5% от числа гнездящихся пар. В пользу значимости заказника в сохранении биотического разнообразия говорит и то, что нами при обследовании всего около 10 км² отмечено 6 видов отряда соколообразных (*Milvus migrans* Boddaert, *Circus aeruginosus* L., *Accipiter gentilis* L., *Buteo buteo* L., *Hieraetus pennatus* Gmelin, *Falco subbuteo* L.), а также 2 вида сов (*Asio otus* L., *Strix aluco* L.).

Наибольшее сходство, согласно индексам Жаккара и Серенсена (табл. 2), наблюдается между орнитофауной обследованных лесных участков, один из которых расположен на правом берегу Ворсклы непосредственно над руслом реки (№1), а второй (№2) – на расстоянии 2–3 км км от русла и от первого участка за автомобильной трассой. Это говорит в пользу наличия связи орнитофауны обоих участков, несмотря на территориальную разрозненность и близость участка леса №2 к населенному пункту Лучки (рис. 1).

Таблица 2.

Сходство сообществ гнездящихся птиц естественных биотопов

Пара биотопов	Число общих видов	Индексы сходства	
		Жаккара	Серенсена
лес №1 – лес №2	38	0,7	0,9
луг влажный №1 – луг влажный №2	15	0,3	0,4
луг влажный в среднем – луг сухой	24	0,4	0,6
степь – луг в среднем	28	0,4	0,6
лес в среднем – луг в среднем	28	0,4	0,6
лес в среднем – степь	38	0,6	0,8

Большое сходство, отмеченное в отношении сообществ птиц, гнездящихся в степных и лесных биотопах, объясняется тем, что степные территории включены фрагментами в байрачные леса. Общими для этих биотопов является 38 видов птиц, гнездящихся на земле, в норах в стенках оврагов или на древесной растительности небольшой высоты. Для них совмещение степных балок с байрачными лесами создает целостность гнездопригодной территории и разнообразие гнездовых и кормовых станций.

Важной характеристикой для лесных биотопов является также численность лесного конька (*Anthus trivialis* L.), обилие и доленое участие которого – существенный показатель рекреационной нагрузки (Захаров, 1986). Возможность для гнездования этот вид получает именно благодаря включению в лесные биотопы степных балок, некомфортных даже для отдыха туристов.

Наименьшее сходство зафиксировано для двух участков влажного заливного луга. В основном это связано с тем, что виды водно-болотного комплекса расположились на гнездовании достаточно антогонистично, и каждый из них гнездится лишь на одном из участков.

Кластерный анализ, проводимый с учетом индексов видового разнообразия, группирует сообщества гнездящихся птиц исследуемых площадок заказника в два блока, а с учетом списка видов и их встречаемости – в три. Оба варианта анализа демонстрируют наибольшее сходство орнитофауны лесных биотопов, степного и биотопов островов Ворсклы. Орнитофауна урбанизированного биотопа управления заказником в первом случае анализа не проявляет сходства с природными биотопами, а во втором – сходна с фауной степного луга (рис. 1).

Луговые биотопы заказника в целом отличаются наибольшим числом видов, видовым разнообразием и степенью равномерности их распределения по численности. Здесь наблюдается наименьший вес доминирующих видов. Видовое богатство степных биотопов характеризуется наиболее низкими значениями (табл. 3). Поскольку орнитофауна – один из самых показательных индикаторов благополучия экосистемы, ситуация с сообществом гнездящихся птиц в степных биотопах берегов Ворсклы указывает на то, что степные экосистемы низовьев Ворсклы находятся в наиболее уязвимом состоянии и требуют особого внимания для защиты их от рекреационной нагрузки.

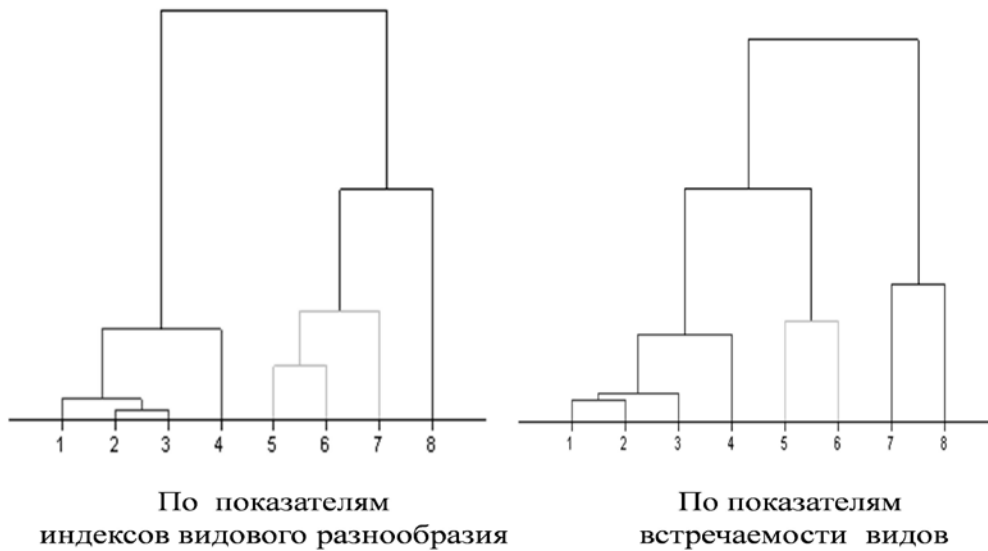


Рис. 3. Сходство сообществ гнездящихся птиц модельных участков заказника «Лучковский»: 1 – участок леса №1, 2 – участок леса №2, 3 – степной, 4 – острова, 5 – влажный луг №1, 6 – влажный луг №2, 7 – сухой луг, 8 – селитебный биотоп.

Таблица 3.

Разнообразие сообществ гнездящихся птиц

Индекс	Биотопы			
	лесные	степные	луговые	селитебный
разнообразия Маргалефа	10,15	7,12	11,94	5,09
разнообразия Менхиника	5,15	2,95	5,87	2,10
разнообразия Шеннона	3,33	2,98	3,59	2,83
разнообразия Симпсона	2,41	1,30	2,73	1,19
доминирования Симпсона	0,42	0,77	0,37	0,84
доминирования Бергера-Паркера	0,11	0,17	0,08	0,18
выравнивания Макинтоша	0,91	0,86	0,94	0,88
выравнивание Пиелу	2,01	1,90	2,07	1,98

При исследовании орнитофауны заказника мы выявили интересные особенности освоения птицами гнездовых стаций. Например, большая синица (*Parus major* L.) здесь гнездится в прошлогодних норах золотистой шурки в оврагах степных балок (обнаружено 2 гнезда, обустроенных таким образом). Один из авторов наблюдал такой способ гнездования большой синицы и в Тульской области в береговой стенке реки Дудик. Территория заказника «Лучковский» изобилует древесной растительностью, кроме того, сотрудники заказника уделяют должное внимание развешиванию искусственных гнезд для птиц. Поэтому говорить о дефиците мест для обустройства гнезд большой синицей не приходится. По-видимому, птицы используют новый способ гнездования, в дополнение к привычным им, в силу своей этологической пластичности. В заказнике «Лучковский» благодаря использованию новых гнездовых стаций большая синица достаточно многочисленна и является субдоминантом не только в сообществах птиц, гнездящихся в байрачном лесу, но и в сообществах птиц степных балок.

В списке орнитофауны низовьев Ворсклы появился клинтух (*Columba oenas* L.), отсутствовавший здесь в конце XX столетия. В качестве мест гнездования птицы используют полые

железобетонные столбы линий электропередач, расположенные вдоль трассы. Обнаружено 5 пар птиц, гнездящихся таким образом в столбах на влажном лугу левого берега Ворсклы. Две из этих пар поселились на соседних столбах, на расстоянии 20 м. Еще 3 пары клинтуха отмечены в байрачном лесу на правом берегу Ворсклы. Птицы совершали облет территории парами на границе леса и степного биотопа на склоне берега. Одна из пар также гнездилась в столбе линий электропередач. Следует отметить, что все места гнездования находились рядом с древесными насаждениями. Использование клинтухом в качестве гнездовой стаций железобетонных столбов зафиксировано коллегами в Черкасской и Луганской областях (Ветров, Олейник, 2011; Гаврилюк, 2014). Все поселения птиц, обнаруженные как нами, так и нашими коллегами, были агрегированными. Это позволяет предположить, что при отсутствии пресса со стороны человека клинтух достаточно быстро сможет восстановить свою численность и широко расселиться, а в перспективе, возможно и синантропизироваться. Ранее данную экологическую нишу использовали галки (*Corvus monedula* L.). Сейчас галки не обитают в заказнике. Был ли этот вид вытеснен клинтухом или покинул заказник вследствие иных причин – не выяснено.

Говоря о голубях, хочется обратить внимание на то, что из сообщества гнездящихся птиц заказника «Лучковский» элиминировал вяхирь (*Columba palumbus* L.), гнездившийся здесь в конце XX столетия. Вид отсутствует как в природных биотопах, так и в трансформированных. Возможно, это связано с тем, что вяхирь в последние десятилетия активно синантропизируется, и этот процесс уже распространился и на популяции, обитающие на территории центральной Украины (Шупова, 2014). В результате синантропизации вяхиря природные его популяции, как правило, снижают численность, а синантропные увеличивают. Но для Полтавской области синантропных популяций вяхиря на данный момент не описано.

Следует отметить, что в заказнике перестала гнездиться сизоворонка (*Coracias garrulus* L.), что говорит о прогрессирующем сужении гнездового ареала вида (Шупова, 2015). Зимородок (*Alcedo atthis* L.), который с конца XX столетия адаптировался в исследуемом регионе к гнездованию не только в береговых обрывах реки, но и в оврагах байрачных лесов, удаленных от русла (Шупова, 2011, 2015), продолжает обитать в этих оврагах и увеличивает количество таких поселений. Птицы селятся все дальше от реки и сейчас гнездятся даже в байрачном лесу, путь к которому от реки пересекает активно используемую автомобильную трассу.

Мы хотим обратить внимание также на отсутствие таких широко распространенных видов, как сорока (*Pica pica* L.) и серая ворона (*Corvus cornix* L.). Птицы не гнездятся и в природных биотопах, и в трансформированных. В конце XX столетия эти виды обитали в заказнике. Причины их исчезновения также не понятны, хотя, возможно, они связаны с появлением здесь ушастой совы, отсутствовавшей ранее. Серая ворона отмечена исключительно на островах поймы, притом, возможно, что птицы прилетели туда с левого берега из села Ольховатка. В любом случае, отсутствие этих видов в сообществах гнездящихся птиц благоприятно для обитания уязвимых видов.

Выводы

Таким образом, в заказнике «Лучковский», расположенном на границе двух физико-географических зон (степной и лесостепной), гнездится 88 видов птиц 15 отрядов, общей плотностью 98 пар/км². Наиболее плотно населен птицами участок степного разнотравья крутого склона правого берега: 196,7 пар/км². Средняя плотность гнездования птиц береговых биотопов заказника составляет 1,2±0,17 пар/км². Орнитофауна представлена 11 ландшафтно-генетическими фаунистическими комплексами, доминирует среди которых неморальный (17 видов), и 4 экологическими группировками, где преобладают дендрофилы (46 видов). Мозаичность ландшафта заказника приводит к сходству орнитофауны различных биотопов, и особенно степных с лесными. Общими для всех биотопов берегов Ворсклы является 15 видов птиц, а для лесных и степных – 38 видов, гнездящихся на земле, в норах эрозионных обнажений оврагов или на древесной растительности. На территории заказника наиболее массовыми являются зяблик (Pi=0,09), золотистая щурка (Pi=0,06), черный дрозд (Pi=0,05). Луговые биотопы заказника отличаются наибольшим числом видов, видовым разнообразием и степенью равномерности их распределения по численности. Видовое богатство степных биотопов характеризуется наиболее низкими значениями. Наличие большого количества гнездящихся видов птиц на земле (20,5%) и приземно-кустарниковом ярусе (19,3%) указывает на то, что рекреационная нагрузка на биотопы является умеренной и не несет угрозы деградации биотопам заказника, за исключением степных.

Список литературы

- Бельский Е.А. Экология птиц импактных регионов. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук / 03.00.16 – экология. – Екатеринбург, 2010. – 18с. /Belskiy Ye.A. Ekologiya ptits impaknykh regionov. Avtoref. dis. ... d-ra biol. Nauk / 03.00.16 – ekologiya. – Yekaterinburg, 2010. – 18s./
- Ветров В.В., Олейник Д.С. Новые данные об особенностях гнездования клинтуха (*Columba oenas*) на востоке Украины // Сомовская библиотека. – Вып.1, кн.2. – Харьков: Точка, 2011. – С. 234–235. /Vetrov V.V., Oleynik D.S. Novye dannye ob osobennostyakh gnezdovaniya klintukha (*Columba oenas*) na vostoке Ukrainy // Somovskaya biblioteka. – Vyp.1, kn.2. – Khar'kov: Tochka, 2011. – S. 234–235./
- Гаврилюк М.Н. Гнездование клинтуха *Columba oenas* в бетонных столбах Черкасской области // Русский орнитологический журнал. – 2014. – Т.23. Экспресс-выпуск. – С. 2546–2547. /Gavriyuk M.N. Gnezdovaniye klintukha *Columba oenas* v betonnykh stolbakh Cherkasskoy oblasti // Russkiy ornitologicheskii zhurnal. – 2014. – T.23. Ekspress-vypusk. – S. 2546–2547./
- Захаров В.Д. Изменение плотности населения птиц как показатель состояния лесных биоценозов // Изучение птиц, их охрана и рациональное использование: Тез. докл. IX Всесоюз. орнитол. конф. Ч.1. – Ленинград, 1986. – С. 235–236. /Zakharov V.D. Izmeneniye plotnosti naseleniya ptits kak pokazatel' sostoyaniya lesnykh biotsenozov // Izucheniye ptits, ikh okhrana i ratsional'noye ispol'zovaniye: Tez. dokl. IX Vsesoyuz. ornitol. konf. Ch.1. – Leningrad, 1986. – S. 235–236./
- Кузьменко Л.П. Орнітокомплекси антропогенних ландшафтів Північно-Східної частини Українського Полісся // Вестник зоологии. – 2000. – Т.34, вып. 1–2. – С.119–121. /Kuzmenko L.P. Ornitokompleksy antropogennykh landshaftiv Pivnichno-Skhidnoyi chastyny Ukrayins'kogo Polissya // Vestnik zoologii. – 2000. – T.34, vyp. 1–2. – S. 119–121./
- Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. – М.: Мир, 1992. – 161с. /Megarran E. Ekologicheskoye raznoobraziye i yego izmereniye. – M.: Mir, 1992. – 161s./
- Національний атлас України. – К.: Картографія, 2007. – 440с. /Natsional'nyy atlas Ukrayiny. – K.: Kartografiya, 2007. – 440s./
- Новиков Г.А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных. – М.: Сов. наука, 1953. – 502с. /Novikov G.A. Polevyeye issledovaniya po ekologii nazemnykh pozvonochnykh. – M.: Sov. nauka, 1953. – 502s./
- Сеник М.А. Орнітофауна як індикатор стану лучних екосистем // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія. – 2008. – Вип.23. – С. 125–128. /Senik M.A. Ornitofauna yak indikator stanu luchnykh ekosistem // Naukovyy visnyk Uzhgorodsk'kogo universytetu. Seriya: Biologiya. – 2008. – Vyp.23. – S. 125–128./
- Соколов А.Ю., Шекало М.В. Изменения степной авифауны под действием антропогенных факторов во второй половине XX – начале XXI века в условиях южной части Центрального Черноземья // Мат. межд. науч.–практ. конф. «Сохранение степных и полупустынных экосистем Евразии». – Алматы, 2013. – С. 44. /Sokolov A.Yu., Shchekalo M.V. Izmeneniya stepnoy avifauny pod deystviyem antropogennykh faktorov vo vtoroy polovine XX – nachale XXI veka v usloviyakh yuzhnoy chasti Tsentral'nogo Chernozem'ya // Mat. mezhhd. nauch.–prakt. konf. «Sokhraneniye stepnykh i polupustynnykh ekosistem Yevrazii». – Almaty, 2013. – S. 44./
- Стецюк Н.О., Кушнір Л.Л., Кушнір Л.М. Антропогенна трансформація пониззя р. Ворскла у зв'язку з побудовою Дніпродзержинського водосховища // Захист довкілля від техногенного впливу: Зб. наукових праць. – 2002. – Вип.6 (8). – С. 114–119. /Stetsyuk N.O., Kushnir L.L., Kushnir L.M. Antropogenna transformatsiya ponyzzya r. Vorskla u zv'yazku z pobudovoyu Dniprodzerzhynsk'kogo vodoshkovyshcha // Zakhyst dovkillya vid tekhnogennogo vplyvu: Zb. naukovykh prats'. – 2002. – Vyp.6 (8). – S. 114–119./
- Шупова Т.В. Экологические особенности обыкновенного зимородка (*Alcedo atthis* L.), способствующие его приспособлению к обитанию в трансформированных ландшафтах // Сомовская библиотека. – Вып.1, кн.2. – Харьков: Точка, 2011. – С. 258–266. /Shupova T.V. Ekologicheskiye osobennosti obyknovennogo zimorodka (*Alcedo atthis* L.), sposobstvuyushchiye yego prispособleniyu k obitaniyu v transformirovannykh landshaftakh // Somovskaya biblioteka. – Vyp.1, kn.2. – Khar'kov: Tochka, 2011. – S. 258–266./
- Шупова Т.В. Роль естественных биотопов в адаптации вяхиря (*Columba palumbus* L.) к синантропному способу гнездования // Мат. IV межд. науч.–практ. конф. «Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов». – Волгоград, 2014. – С. 116–123. /Shupova T.V. Rol' yestestvennykh biotopov v adaptatsii vyakhiryа (*Solumba palumbus* L.) k sinantropnomu sposobu gnezdovaniya // Mat. IV mezhhd. nauch.–prakt. konf. «Izucheniye, sokhraneniye i vosstanovleniye yestestvennykh landshaftov». – Volgograd, 2014. – S. 116–123./
- Шупова Т.В. Ракшеобразные и удообразные птицы заказника «Лучківський» // Мат. XIV Межд. орнитол. конф. Северной Евразии. – Алматы, 2015. – С. 612–613. /Shupova T.V. Raksheobraznyye i udodobraznyye ptitsy zakaznika «Luchkivskiy» // Mat. XIV Mezhhd. ornitol. konf. Severnoy Yevrazii. – Almaty, 2015. – S. 612–613./

Представлено: А.Л.Пономаренко / Presented by: A.L.Ponomarenko

Рецензент: В.А.Токарський / V.A.Tokarsky

Подано до редакції / Received: 19.01.2016

••• КРІОБІОЛОГІЯ ••• CRYOBIOLOGY •••

УДК: 612.649.011.87.014.3:615.014.41:547.569.2

Вплив різних концентрацій криопротектора ДМСО на збереженість, життєздатність та вміст активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові при криоконсервуванні **О.Є.Макашова, Л.О.Бабійчук, О.Л.Зубова, П.М.Зубов**

*Институт проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)
pmzubov@mail.ru*

В роботі представлені результати досліджень щодо відпрацювання підходів з оцінки кількості ядровмісних клітин (ЯВК) кордової крові з надмірним вмістом активних форм кисню (АФК) при використанні флуоресцентного барвника 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату методом проточної цитофлуориметрії. Показано, що як еквилібрація ЯВК протягом однієї години з різними концентраціями проникаючого криопротектора ДМСО, так і їх криоконсервування призводять до зниження збереженості та життєздатності клітин, що може бути викликано пригніченням антиоксидантної системи клітин і, як наслідок, накопиченням надмірної кількості АФК. Отримані результати продемонстрували необхідність розробки технологій криоконсервування з додаванням в криозахисне середовище антиоксидантів з метою запобігання розвитку окисного стресу в клітинах.

Ключові слова: *кордова кров, ядровмісні клітини, криоконсервування, активні форми кисню.*

Влияние различных концентраций криопротектора ДМСО на сохранность, жизнеспособность и содержание активных форм кислорода в ядродержащих клетках кордовой крови при криоконсервировании **Е.Е.Макашова, Л.А.Бабийчук, О.Л.Зубова, П.М.Зубов**

В работе представлены результаты исследований по отработке подходов по оценке количества ядродержащих клеток (ЯСК) кордовой крови с избыточным содержанием активных форм кислорода (АФК) при использовании флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата методом проточной цитофлуориметрии. Показано, что как эквилибрация в течение одного часа ЯСК с различными концентрациями проникающего криопротектора ДМСО, так и криоконсервирование приводят к снижению сохранности и жизнеспособности клеток, что может быть вызвано угнетением антиоксидантной системы клеток и, как следствие, накоплением избыточного количества АФК. Полученные результаты показали необходимость разработки технологий криоконсервирования с добавлением в криозащитную среду антиоксидантов с целью предотвращения развития окислительного стресса в клетках.

Ключевые слова: *кордовая кровь, ядродержащие клетки, криоконсервирование, активные формы кислорода.*

Effect of various concentrations of the cryoprotectant DMSO on safety, viability and content of reactive oxygen species in cord blood nucleated cells during cryopreservation **E.E.Makashova, L.A.Babijchuk, O.L.Zubova, P.M.Zubov**

The paper presents the results of the study of development of approaches to assess the number of cord blood nucleated cells (NC) with excessive reactive oxygen species (ROS) content with the fluorescent dye 2',7'-dihloridigidrofluorestsein diacetate by flow cytometry. Both exposure of NC for one hour with various concentrations of penetrating cryoprotectant DMSO and their cryopreservation resulted in reduced cell safety and viability that may be caused by inhibition of cell antioxidant system with the following accumulation of excessive content of ROS in cells. The results obtained showed the necessity of the addition of antioxidants into cryoprotective medium to prevent oxidative stress inside cells for improving cryopreservation techniques.

Key words: *cord blood, nucleated cells, cryopreservation, reactive oxygen species.*

Вступ

Медичні центри різних країн все частіше використовують аутологічні та алогенні гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК). Кордова кров (КК) є одним з основних джерел отримання стовбурових клітин. Трансплантація ГСК, отриманих з КК, розвивається найбільш швидкими темпами. Тільки в одному американському реєстрі (National Marrow Donor Program) зберігається понад 50000 зразків стовбурових клітин, отриманих з КК. Широкого поширення набуло використання стовбурових клітин кордової крові людини для лікування пацієнтів при цілому ряді онкологічних, імунологічних захворювань, а також гемоглобінопатіях, порушеннях кровотворення та інших патологічних станах. Наукові центри активно вивчають біохімічні особливості, терапевтичну ефективність КК та отриманих з неї клітинних і безклітинних препаратів (Khomenko et al., 2014; Passweg et al., 2014).

Всезростаюча увага з боку вчених і лікарів до використання КК призвела до необхідності створення банків, у яких зразки зберігаються в замороженому стані при температурі -196°C без втрати їх біологічних властивостей. Проте ефективність криоконсервованих препаратів КК в значній мірі залежить від кількості збережених клітин та їх функціональної активності після розморожування. Ці показники повністю віддзеркалюють, наскільки оптимальними були методи сепарації, обробка криопротектором, криоконсервування, зберігання в замороженому стані та розморожування. Тому особливу увагу науковці приділяють безпосередньо підготовці КК до тривалого зберігання й вибору оптимальних технологій криоконсервування її зразків (Armitage, 2015).

Для заморожування ядровмісних клітин (ЯВК) КК, до складу яких входять і стовбурові гемопоетичні, найбільш широко використовується криопротектор диметилсульфоксид (ДМСО) в концентраціях 7,5–15 % (Nayakawa et al., 2010; Yamaguchi et al., 2014). Однак еквілібрація клітинної суспензії з ДМСО здатна викликати порушення структурно-функціональних і метаболічних властивостей клітин, призводячи до втрати їх збереженості і життєздатності, що зумовлено його токсичністю. Одним із проявів токсичного ефекту, окрім руйнування плазматичної мембрани з наступним некрозом, викликаним формуванням внутрішньоклітинного льоду й дією осмотичного стресу, може бути накопичення високих концентрацій активних форм кисню (АФК), які здатні призвести до ініціації апоптозу та загибелі клітин як до, так і після криоконсервування (Kim et al., 2015). В результаті збільшення в клітинах вільних радикалів може відбуватися порушення енергетичного стану та пошкодження мембран клітин через перекисне окислення ліпідів, а також пошкодження ДНК, що призводить до апоптозу. Тому дуже важливим є запобігання їх накопиченню вже на етапі еквілібрації з криопротектором, що дозволить уникнути або сповільнити розвиток окислативного стресу.

Виходячи з вище наведеного, метою роботи була оцінка збереженості, життєздатності та кількості клітин з надмірним вмістом активних форм кисню до та після криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові з різними концентраціями ДМСО.

Об'єкти та методи дослідження

Використовувалася КК людини, отримана після нормальних пологів при наявності інформованої згоди породіллі. Матеріал заготовляли на консерванті "CPD". Клітинну суспензію ядровмісних клітин отримували шляхом седиментації еритроцитів КК з використанням 6% розчину декстрану з молекулярною масою 60000 (поліглюкін). Для криоконсервування використовували проникаючий криопротектор ДМСО у концентраціях 2,5; 5; 7,5; 10 та 15%. Заморожування проводили в програмному заморожувачі "Cryoson" (Німеччина) зі швидкістю $1-3^{\circ}\text{C}$ в хвилину до -80°C , з наступним зануренням у рідкий азот. Підрахунок клітин проводили в камері Горяєва згідно стандартної методики (Basic Cell Culture, 2002). Для оцінки CD45⁺-клітин і їх життєздатності використовували стандартний протокол імунофенотипування з використанням CD45FITC і 7AAD (Schmid et al., 1992). АФК в клітинах визначали методом проточної цитофлуориметрії на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD, США) по накопиченню високолюмінесцентного 2',7'-дихлорофлуоресцеїну (ДСФ). Приготування розчину ДСФ проводили на ДМСО. Додаткова концентрація ДМСО після внесення ДСФ в пробу не перевищувала 0,025%. Після внесення розчину ДСФ клітинну суспензію інкубували 30 хв. на водяній бані при 37°C у темряві. Результати вимірювань оцінювали за допомогою програмного забезпечення фірми BD - CELLQuest Pro (Soh, 2006). Для моделювання трансфузії частину клітин після розморожування переносили у розчин Хенкса та інкубували при 37°C протягом 1 години. Розведення складало 1:10.

Статистичну обробку результатів проводили методом Стьюдента-Фішера, з використанням програми Excel.

Результати та обговорення

Як вже було зазначено вище, внаслідок впливу на ядровмісні клітини фізико-хімічних факторів кріоконсервування при сепарації, еквілібрації з кріопротектором, програмному заморожуванні та відігріванні відбувається порушення метаболічних процесів, одним з проявів якого може бути збільшення в клітинах кількості активних форм кисню.

У фізіологічних умовах шкідливі ефекти АФК мінімізуються захисними механізмами антиоксидантної системи, яка інактивує їх і запобігає надмірному накопиченню. Однак, дисбаланс в прооксидантно/антиоксидантній рівновазі здатний приводити до окислювального стресу (Schieber, Chandel, 2014). Отже, дуже важливим завданням для науковців є моніторинг їх вмісту під час впливу фізико-хімічних факторів кріоконсервування.

Рядом авторів було показано, що флуоресцентні зонди особливо ефективні для цих цілей. У зв'язку з цим багато барвників було синтезовано і використано для вимірювання АФК (Bartosz, 2006). Однак тільки деякі зонди пройшли комплексну оцінку і отримали широке визнання у дослідників. Одним з найбільш популярних є 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетат (DCFH2-DA) (Chen et al., 2010). Проте навіть при широкому застосуванні в біологічних дослідженнях існують суперечливі дані щодо методичних підходів по визначенню АФК в різних клітинах: немає єдиної думки в питанні пробопідготовки перед аналізом на проточному цитофлуориметрі (оптимальна концентрація ДСФ, використовувана для аналізу, умови інкубації клітин із зондом, необхідність відмивання клітин від флуоресцентного барвника) (Wardman, 2007).

Виходячи з вище сказаного, нами була проведена серія експериментів з відпрацювання оптимальної методики визначення АФК в ЯВК КК за допомогою ДСФ.

Оскільки найчастіше використовують концентрації ДСФ від 3 до 30 мкМ, нами були проаналізовані результати, отримані при використанні наступних концентрацій барвника: 2,5 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 25 мкМ і 35 мкМ (Kalyanaraman et al., 2012; Rhee et al., 2010; Shen et al., 2013; Tetz et al., 2013). Аналіз проводився в наступних експериментальних групах (рис. 1):

- А. Контроль – клітини, виділені декстраном (експ. група – «контр.»);
- Б. Клітини, виділені декстраном і оброблені 7,5% ДМСО (експ. група – «ДМСО»);
- В. Клітини, виділені декстраном, оброблені 7,5% ДМСО і кріоконсервовані зі швидкістю 1–3°C/хв. (експ. група – «3°C/хв.»);
- Г. Клітини, виділені декстраном, оброблені 7,5% ДМСО і кріоконсервовані прямим зануренням у рідкий азот (експ. група – «LN₂»).

Результати експериментів представлені на рис. 1.

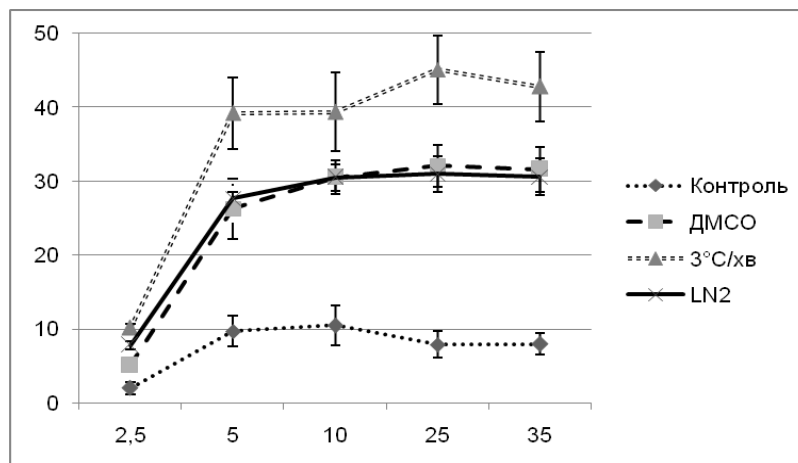


Рис. 1. Кількість клітин з надмірним вмістом активних форм кисню залежно від концентрації ДСФ в пробі, %

Із рис. 1 видно, що при внесенні ДСФ в концентрації 2,5 мкМ спостерігалася мінімальна кількість ДСФ⁺-клітин. Зі збільшенням концентрації до 5 мкМ відбувалося різке їх збільшення. Подальше зростання концентрації ДСФ не призводило до достовірних змін досліджуваного показника.

Таким чином, ми встановили, що оптимальною концентрацією ДСФ для оцінки числа ядерних клітин кордової крові, що містять надмірну кількість АФК, є 5 мкМ.

Ще одним дискусійним питанням залишається необхідність відмивання клітинної суспензії від даного флуоресцентного зонда. Ряд авторів вказує на необхідність проведення даної маніпуляції, інші її виключають, обґрунтовуючи свій вибір можливістю елімінації частини клітин з аналізу внаслідок видалення їх з супернатантом і, як наслідок, викривлення «реальної картини». У зв'язку з цим нами була проведена перевірка необхідності відмивання клітин від даного флуоресцентного барвника. З цією метою після інкубації клітинної суспензії з ДСФ було проведено м'яке осадження клітин центрифугуванням при 800 об/хв. протягом 5 хв. з подальшим видаленням супернатанта і внесенням 1 мл фізіологічного розчину. Як видно з рис. 2, у невідмитій суспензії ЯВК спостерігаються підвищені показники неспецифічної флуоресценції, що унеможливує коректний аналіз цитограм і дозволяє зробити висновок про необхідність відмивання суспензії клітин від ДСФ, оскільки після відмивання на логарифмічній шкалі цитограм спостерігається чітка межа між забарвленими і незабарвленими клітинами.

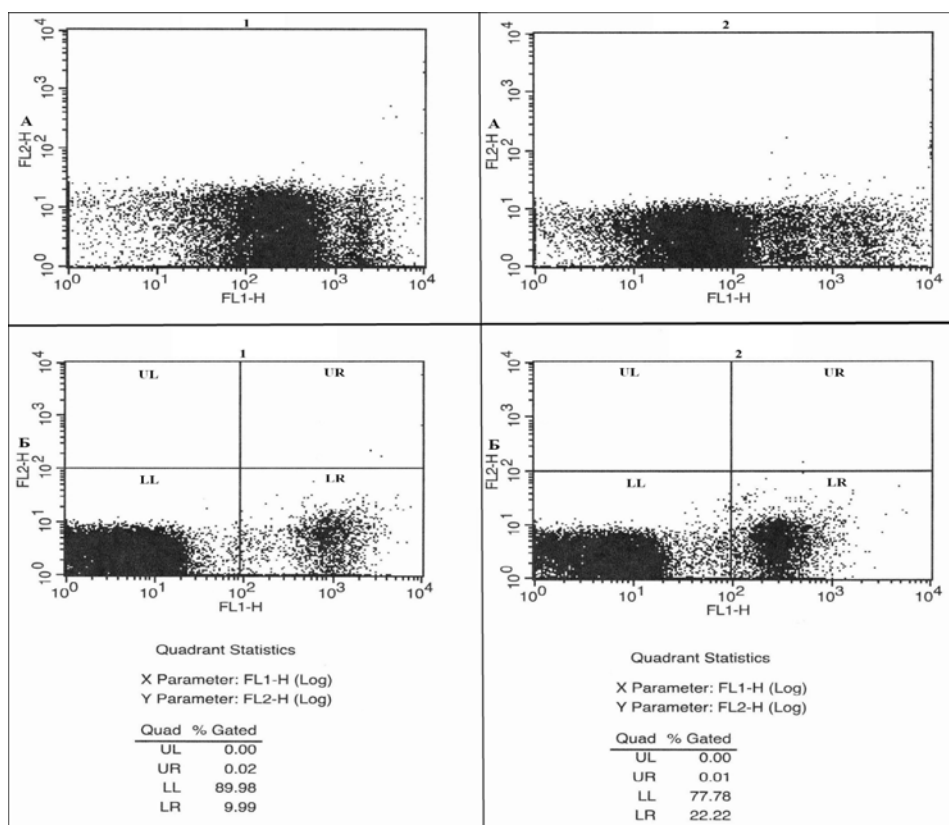


Рис. 2. Цитограми ядровмісних клітин невідмитих (А) та відмитих від ДСФ (Б). 1. ядровмісні клітини, виділені декстраном. 2. ядровмісні клітини, оброблені 5% ДМСО

Найбільш часто для криоконсервування ЯВК КК використовується проникаючий криопротектор ДМСО. Його захисна дія ґрунтується на високій швидкості проникнення через клітинну мембрану та утворенні великої кількості водневих зв'язків з молекулами рідкої фази клітини. Це призводить до зниження ймовірності утворення внутрішньоклітинних кристалів льоду, а також до зниження ефекту концентрування внутрішньоклітинних солей при негативних температурах, що зменшує ступінь крипошкодження клітини (Chen et al., 2016). Однак, крім криозахисних властивостей, ДМСО має токсичну дію по відношенню до біооб'єктів, викликаючи порушення структурно-функціональних і метаболічних властивостей клітин, призводячи до втрати їх збереженості і життєздатності (Fry et al., 2015). Слід зазначити, що ступінь токсичного ефекту безпосередньо залежить від концентрації ДМСО, а також температурних режимів еквілібрації. Крім того, наявні в даний час протоколи

кріоконсервування ЯВК КК використовують концентрацію ДМСО, час еквілібрації з ним та програму кріоконсервування, встановлену для прогеніторних клітин кісткового мозку та периферичної крові. Кріоконсервування за цими протоколами може призводити до втрат до 50% популяції ядерних клітин КК, а враховуючи обмежений обсяг при заготівлі, такі втрати неприйнятні.

Виходячи з цього, нашим наступним завданням була оцінка впливу різних концентрацій проникаючого кріопротектора ДМСО на структурно-функціональні властивості і життєздатність ЯВК КК на етапі еквілібрації. У нашій роботі ми використовували ДМСО в концентраціях 2,5–15 % і час інкубації 0–60 хвилин.

При дослідженні впливу різних концентрацій ДМСО і часу еквілібрації з ним на збереження ЯВК, можна констатувати той факт, що збільшення як концентрації кріопротектору, так і часу еквілібрації з ним (особливо після 30 хв.) викликає зниження кількості клітин (табл. 1). Ці зміни більш виражені при підвищенні концентрації ДМСО, особливо до 10 і 15%.

Таблиця 1.
Збереженість та життєздатність ядровмісних клітин кордової крові залежно від концентрації ДМСО і часу еквілібрації

Концентрація ДМСО, %		Час інкубації, хв.				
		0	15	30	45	60
2,5	А	99,6±2,4	99,2±1,09	98,8±0,91	98,8±1,23	97,6±1,63
	Б	97,2±1,48	96,1±1,42	95,6±1,58	95,0±1,74	95,8±0,92
5	А	98,8±0,96	98,8±0,92	98,4±0,76	96,4±1,41	95,6±0,76*
	Б	97,0±0,8	95,3±0,64*	94,5±1,42*	94,6±0,98*	96,0±1,17
7,5	А	96,4±1,38	95,6±0,76	95,6±2,8	91,6±0,75*	87,6±2,37*
	Б	96,6±0,64	95,3±1,8	94,4±2,13	94,7±1,31	96,2±1,45
10	А	96,4±0,78	96,0±0,86	87,6±2,92*	83,7±2,15*	71,7±2,92*
	Б	95,5±0,92	94,6±0,78	92,0±1,74*	92,8±1,45*	95,5±1,4
15	А	95,6±2,12	91,6±1,98	83,7±2,48*	72,5±2,98*	65,3±2,54м
	Б	95,3±2,32	94,7±1,91	91,8±1,62	92,9±1,74	95,0±0,68

*Примітка: А – збереженість (%); Б – життєздатність (%). Дані представлені у відсотках, у вигляді М±SE. * – результати відрізняються від нульвої точки інкубації з ДМСО з рівнем p<0,05.*

Аналіз життєздатності показав (табл. 1), що до 30 хв. інкубації з ДМСО відбувається недостовірне зниження даного параметра, але подальше збільшення числа життєздатних клітин вказує лише на відносність цього показника, пов'язаного з руйнуванням частини клітин, що йдуть в аналіз (про що свідчать дані зі збереженості).

Як вже говорилося раніше, одним із проявів токсичності кріопротектора може бути накопичення високих концентрацій АФК, які здатні привести до розвитку апоптозу і загибелі клітин, як на стадії обробки кріопротектором, так і при заморожуванні-відігріванні. Виходячи з цього, визначення їхнього вмісту може бути одним з ключових інтегральних параметрів оцінки стану ЯВК КК.

Отримані дані по визначенню кількості клітин з надмірним вмістом АФК показали, що зі збільшенням концентрації ДМСО і часу еквілібрації з ним відбувається достовірне збільшення даного показника (рис. 3), що може вказувати як на розвиток окисного стресу, так і на інгібування антиоксидантної системи в клітинах.

Найбільш небезпечними етапами для клітин при кріоконсервуванні є стадії безпосередньо заморожування і розморожування. Основна маса ушкоджень клітинних структур в період заморожування прямо або опосередковано пов'язана з утворенням кристалів льоду, в результаті чого живі системи піддаються впливу комплексу факторів. Серед них суттєве значення мають внутрішньоклітинна кристалізація і, як наслідок, гіперконцентрація солей, зміна іонної сили розчину, зміна величини рН, дегідратація та фазові перетворення біополімерів і надмолекулярних структур. Всі ці зміни здійснюють дуже сильний «стресовий вплив» на клітини, в результаті яких змінюються властивості мембранної поверхні, структурної впорядкованості ліпідів, конформації периферичних та інтегральних білків, відбувається дисбаланс прооксидант-антиоксидантної системи клітини та інші зміни. Тому основним завданням кріобіологів при розробці технологій кріоконсервування є мінімізація факторів, що призводять до розвитку патологічних і незворотних процесів в клітинах.

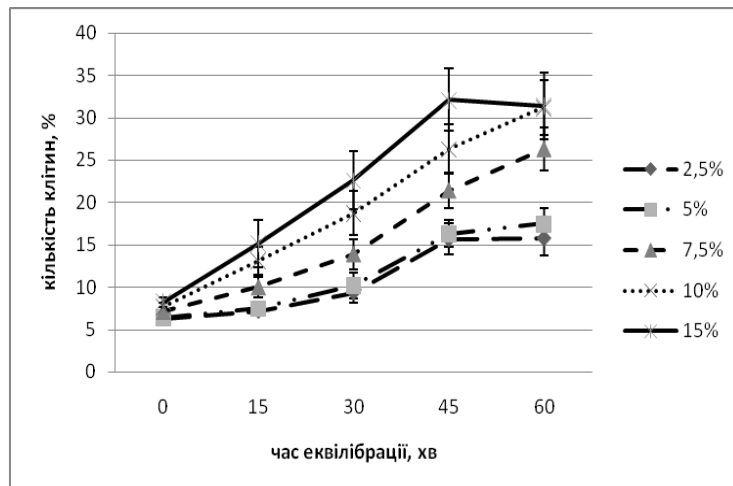


Рис. 3. Кількість клітин з надмірним вмістом активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові залежно від концентрації ДМСО і часу еквілібрації

Виходячи з цього, наступним нашим завданням було оцінити ефективність криоконсервування ЯВК КК в криозахисних розчинах, що містять різні концентрації ДМСО, за визначенням збереженості, життєздатності клітин і кількості ЯВК з надмірним вмістом АФК.

Результати проведених експериментів показали (табл. 2), що найвищі показники збереженості та життєздатності спостерігалися при заморожуванні суспензії клітин з 7,5% розчином ДМСО, що відповідає даним криобанків, які криоконсервують кордову кров.

Таблиця 2.
Збереженість і життєздатність ядровмісних клітин кордової крові після заморожування з ДМСО різної концентрації

Концентрація ДМСО, %	Збереженість	Життєздатність
2,5	47,2±3,7	21,8±5,1
5	70,5±2,7	75,2±3,9
7,5	78,0±4,1	78,5±4,2
10	77,6±3,9	76,9±3,1
15	73,0±3,7	72,1±3,8

Примітка: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$.

На наступному етапі були проведені експерименти з оцінки числа клітин, що містять надмірну кількість АФК. Заморожування-відігрівання призводить до більш вираженого збільшення вмісту АФК в ЯВК КК, порівняно з даними, отриманими до криоконсервування (табл. 3).

Максимальна кількість клітин з надлишковим вмістом АФК спостерігалася при криоконсервуванні з 5% ДМСО. Дані, отримані при заморожуванні з 7,5, 10 та 15% ДМСО, достовірно не відрізнялися. Слід зазначити, що мінімальна кількість клітин з надмірним вмістом АФК була в пробі, криоконсервованій з 2,5% ДМСО. Це вказує виключно на те, що при даному методі заморожування відбувається значна втрата клітин через вкрай недостатню концентрацію криопротектора, в результаті чого залишається популяція максимально криостійких клітин.

Після отриманих нами результатів було доцільним вивчити збереженість, життєздатність і вміст АФК в клітинах ЯВК після моделювання трансфузії. Для цього використовували просту модель, відтворюючи в експерименті лише основні принципи трансфузії: розведення деконсервованої клітинної суспензії, яке відбувається природним чином в кровоносному руслі реципієнта; ізоосмотичність середовища та температуру інкубації (37°C). Підтримка температури 37°C протягом усього періоду інкубування клітин – важливий фактор, що дозволяє виявити порушення метаболізму,

оскільки збереження клітин в умовах більш низьких температур маскує можливий дисбаланс в клітинному метаболізмі в силу уповільнення функціональної активності практично всіх процесів при зниженні температури. Так само слід зазначити, що відносна нетривалість трансфузії (1 година) все ж здатна забезпечити цілком задовільні умови для оцінки стабільності кріоконсервованих ЯВК КК в фізіологічних умовах. Для цих цілей частину клітин після розморожування переносили в розчин Хенкса та інкубували при 37°C протягом 1 години. Як видно з табл. 4, отримані результати в значній мірі залежать від концентрації кріопротектора, яка використовувалась при заморожуванні.

Таблиця 3.

Кількість клітин з надмірним вмістом активних форм кисню в ядровмісних клітинах кордової крові до і після заморожування-відігрівання в залежності від концентрації ДМСО

Концентрація ДМСО, %	Вміст АФК до кріоконсервування	Вміст АФК після кріоконсервування
2,5	4,9±1,8	17,1±4,6
5	7,5±2,1	29,5±2,7
7,5	10,3±1,8	20,6±2,1*
10	12,4±1,3*	21,2±1,7*
15	12,8±1,6*	22,1±1,9*

Примітка: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – достовірно по відношенню до проб, кріоконсервованих з 5% ДМСО.

Таблиця 4.

Збереженість, життєздатність і кількість клітин з надмірним вмістом АФК в ЯВК КК після заморожування з ДМСО різної концентрації та проведення трансфузії

Конц. ДМСО, %	Збереженість	Життєздатність	Вміст АФК
2,5	24,1±8,4	38,4±6,5	7,5±2,4
5	54,3±3,8	61,7±2,1	14,1±3,3
7,5	71,5±3,9*	75,6±5,3*	18,9±1,2
10	75,1±5,9*	72,3±4,7*	23,4±6,1*
15	70,4±4,6*	70,8±3,7*	21,5±4,2*

Примітка: дані представлені у відсотках, у вигляді $M \pm SE$. * – достовірно по відношенню до проб, кріоконсервованих з 2,5 та 5% ДМСО.

Найнижчі показники були в пробах, кріоконсервованих з 2,5% ДМСО, а найкращі – при кріоконсервуванні з 7,5, 10 і 15% ДМСО, хоча навіть в цих експериментальних групах як абсолютні втрати клітин, так і їх життєздатність були достовірно нижчими, ніж відразу після розморожування.

Виходячи з отриманих результатів, нами було встановлено, що в процесі кріоконсервування відбувається зниження збереженості і життєздатності ЯВК. І чим менше оптимізоване кріозахисне середовище (не досягнута або перевищена ефективна концентрація кріопротектора), тим ці зміни більш виражені. Однією з причин цього є накопичення АФК, ймовірно в силу інгібування АОС при впливі фізико-хімічних стрес-факторів кріоконсервування.

У зв'язку із отриманими результатами доцільно буде провести дослідження з оцінки ефективності внесення антиоксидантів в кріозахисні розчини з метою зменшення накопичення АФК і запобігання розвитку окисного стресу в клітинах.

Висновки

1. Проведені дослідження дозволили відпрацювати методичні підходи щодо оцінки кількості ядровмісних клітин кордової крові з надмірним вмістом АФК при використанні флуоресцентного барвника 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн діацетату.

2. Еквілібрація протягом однієї години ЯВК з різними концентраціями проникаючого кріопротектора ДМСО призводить до зниження збереження і життєздатності клітин. Вираженість цього процесу прямопропорційна концентрації ДМСО і часу еквілібрації з ним.

3. Описані в другому висновку зміни можуть відбуватися за рахунок накопичення в клітинах активних форм кисню, внаслідок інгібування антиоксидантної системи та розвитку окисного стресу.

4. Отримані результати по кількості збережених і життєздатних клітин, а також клітин, що містять надмірну кількість АФК, відразу після криоконсервування та після моделювання трансфузії продемонстрували необхідність розробки технологій криоконсервування з додаванням в криозахисне середовище антиоксидантів з метою запобігання розвитку окисного стресу в клітинах.

Список літератури

- Armitage S. Cord blood banking standards: autologous versus altruistic // *Front. Med. (Lausanne)*. – 2015. – no 2. – P.94.
- Basic cell culture. A practical approach / Ed. J.M.Davis. – Oxford: Oxford University Press. – 2002. – 382p.
- Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species // *Clin. Chim. Acta.* – 2006. – Vol.368. – P. 53–76.
- Chen G., Yue A., Ruan Z. et al. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood // *Stem Cells Int.* – 2016. – Vol.2016. – Article ID 1396783.
- Chen X., Zhong H.Z., Xu Z. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy // *Free Radical Research.* – 2010. – Vol.44, no 6. – P. 587–604.
- Fry L.J., Querol S., Gomez S.G. et al. Assessing the toxic effects of DMSO on cord blood to determine exposure time limits and the optimum concentration for cryopreservation // *Vox Sang.* – 2015. – Vol.109, no 2. – P. 181–190.
- Hayakawa J., Joyal E.G., Gildner J.F. et al. 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and pentastarch improves cryopreservation of cord blood cells over 10% DMSO // *Transfusion.* – 2010. – Vol.50 (10). – P. 2158–2166.
- Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Kelvin J.A. Davies et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations // *Free Radic. Biol. Med.* – 2012. – Vol.52, no 1. – P. 1–6.
- Khomenko V.I., Bychkov V.V., Bazyka D.A. State of development of hematopoietic stem cell transplantation in the Europe and world // *Lik. Sprava.* – 2014. – Vol. 7–8. – P. 117–121.
- Kim K.M., Huh J.Y., Hong S.S., Kang M.S. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage // *Transfusion.* – 2015. – Vol.55 (8). – P. 2017–2022.
- Passweg J.R., Baldomero H., Peters C. et al. Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – Vol.49, no 6. – P. 744–750.
- Rhee S.G., Chang T.S., Jeong W., Kang D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells // *Mol. Cells.* – 2010. – Vol.29, no 6. – P. 539–549.
- Schmid I., Krall W.J., Uittenbogaart C.H. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color laser flow cytometry // *Cytometry.* – 1992. – Vol.13. – P. 204–208.
- Schieber M., Chandel N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress // *Curr. Biol.* – 2014. – Vol.24 (10). – P. 453–462.
- Shen W.J., Hsieh C.Y., Chen C.L. et al. A modified fixed staining method for the simultaneous measurement of reactive oxygen species and oxidative responses // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol.430, no 1. – P. 442–447.
- Soh N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – Vol.386. – P. 532–543.
- Tetz L.M., Kamau P.W., Cheng A.A. et al. Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 2013. – Vol.67, no 2. – P. 56–60.
- Yamaguchi R., Takanashi M., Ito M. et al. Plasticizer concentration in cord blood cryopreserved with DMSO // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. – Vol.49 (1). – P. 157–158.
- Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – Vol.43. – P. 995–1022.

Представлено: Н.Г.Малова / Presented by: N.G.Malova

Рецензент: Ю.Г.Кот / Yu.G.Kot

Подано до редакції / Received: 01.04.2016

••• ФІЗИОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН •••
••• PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS •••

УДК: 611.631.084.089

Вживаність сім'яників новонароджених мишей при їх алотрансплантації дорослим тваринам під ниркову капсулу чи всередину сім'яника
О.В.Пахомов

*Институт проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Харків, Україна)
aleksandr.pakhomov2017@yandex.ru*

У представленій роботі нами був проведений порівняльний аналіз виживаності і розвитку трансплантата сім'яників новонароджених тварин в імунопривілейованому органі, а саме у сім'янику дорослої тварини, з виживаністю в неімунопривілейованому – під нирковою капсулою. Трансплантат під нирковою капсулою не розвивався. Він відторгався за гострим механізмом упродовж перших 2–3 тижнів після операції. Сім'яник новонароджених мишей був здатний розвиватися тільки в умовах інтратестикулярної трансплантації. Через 15 діб після інтратестикулярної трансплантації в сім'яних канальцях трансплантата утворювалися сперматоцити першого порядку. В подальшому спостерігалось зростання реакцій імунологічного відторгнення, яке призводило до поступової деструкції сім'яних канальців. Судячи з картини спостереження, механізм відторгнення трансплантату був хронічний, на що вказує наявність донорських клітин через 60 діб після трансплантації та відсутність вогнищ лімфоцитарного інфільтрату. При інтратестикулярній трансплантації клітинний механізм, що характерний для гострого відторгнення, не був реалізований повністю. Цей факт вказує на можливість використання в якості місця для трансплантації сім'яника дорослої особи. Він здатен за певних умов подовжувати виживаність донорської тканини. Крім того, в роботі було показано можливість використання сім'яника новонароджених як об'єкту для трансплантації.

Ключові слова: трансплантація, сім'яник, яєчко, імунопривілейованість, імунологічна толерантність, імунологічне відторгнення, сперматогенез.

Выживаемость семенников новорожденных мышей при их аллотрансплантации взрослым животным под почечную капсулу или внутрь семенника
А.В.Пахомов

В представленной работе нами был проведен сравнительный анализ выживаемости и развития трансплантата семенников новорожденных животных в иммунопривилегированном органе, а именно семеннике взрослого животного, с выживанием в неиммунопривилегированном – под почечной капсулой. Трансплантат под почечной капсулой не развивался. Он отторгался по острому механизму в первые 2–3 недели после операции. Семенник новорожденных мышей был способен развиваться только в условиях интратестикулярной трансплантации. Через 15 суток интратестикулярной трансплантации в семенных канальцах трансплантата образовывались сперматоциты первого порядка. В дальнейшем наблюдалось нарастание реакций иммунологического отторжения, которое приводило к постепенной деструкции семенных канальцев. Судя по картине криза, механизм отторжения трансплантата был хронический, на что указывает наличие донорских клеток через 60 суток после трансплантации и отсутствие очагов лимфоцитарного инфильтрата. При интратестикулярной трансплантации клеточный механизм, характерный для острого отторжения, не был реализован полностью. Этот факт указывает на возможность использования в качестве места для трансплантации семенника зрелой особи. Он способен в определенных условиях продлевать выживаемость донорской ткани. Кроме того, в работе была показана возможность использования семенника новорожденных, как объекта для трансплантации.

Ключевые слова: трансплантация, семенник, яичко, иммунопривилегированность, иммунологическая толерантность, иммунологическое отторжение, сперматогенез.

Survival of newborn mice testes during allotransplantation under kidney capsule or into testis of adult animals

O.V.Pakhomov

In this study, we carried out a comparative analysis of the graft survival and the development of the testes of newborn animals in immune privileged organs, such as the testes of adult animals, versus their survival in non-immune privileged organs, such as the kidney capsule. The grafts under kidney capsule did not develop. They were acutely rejected for 2 weeks after transplantation. The testis of the newborn mice developed only under the intratesticular transplantation. Fifteen days after the transplantation, the primary spermatocytes formed in the seminiferous tubules of grafts which had been transplanted into the testes. Subsequently, the growth of immunological rejection led to slow destruction of seminiferous tubules. According to the manner of the reactions, it was a chronic rejection, which was evidenced by the presence of donor cells after 60 days under the transplantation and the absence of foci of the lymphocytic infiltration. The cellular mechanism of the acute rejection was not fulfilled completely after the intratesticular transplantation. It was demonstrated that the testes of adult individuals could be used as a site for transplantation, which can prolong donor grafts survival. Moreover, the testes of newborn individuals can be used as potential objects of intratesticular transplantation.

Key words: *transplantation, testis, immune privilege, immunological tolerance, immunological rejection, spermatogenesis.*

Вступ

Імунна привілейованість, що була виявлена в деяких органах і тканинах ссавців, передбачає наявність в них особового імунологічного статусу, який сприяє тривалій виживаності алло- та ксенотрансплантатів (Simpson, 2006). Типовим прикладом імунопривілейованих органів є сім'яники, яєчники, око та мозок. В цих органах імунна привілейованість підтримується завдяки ослабленню вродженої та набутої імунної відповіді. Механізм імунної привілейованості включає редукцію міграції дендритних клітин в лімфатичні вузли і селезінку через зниження кількості лімфоцитів, що проходять через них, та присутність гемато-тканинного бар'єру (Li et al., 2012), продукцію протизапальних цитокінів, наприклад ТФР- β (Chen et al., 1998), локальну експресію молекул, які індують загибель клітин, таких як Fas-ліганд (Griffith et al., 1995), що елімінує ефекторні лімфоцити.

Імунопривілейованість в сім'яниках є побічною ланкою більш глобального механізму, який забезпечує захист аутоантігенів, що походять від гермінативного епітелію, а також системи протидії проникненню патогенної флори з боку циркулюючої крові і сечостатевого тракту. Цей механізм підтримується завдяки координованій дії анатомо-фізіологічної структури сім'яників, встановленню системної імунної толерантності і активної локальної імуносупресії. Порушення цього механізму часто призводить до катастрофічних незворотних наслідків для організму – розвитку безпліддя.

Специфічна етіологія чоловічого безпліддя включає системні захворювання, такі як ендокринопатії, інфекційні захворювання, рак, варикоцеле, обструктивний синдром, генетичні та хромосомні захворювання, гіпогонадізм, крипторхізм. Приблизно 12% випадків чоловічої дисфункції статевої системи невідомого походження або є наслідком декількох чинників (Aronte et al., 2013). У зв'язку з цим органна трансплантація сім'яників, як можливий експериментальний метод корекції порушень чоловічого безпліддя, становить значний інтерес (Li et al., 2010). У даній роботі нами був проведений порівняльний аналіз виживаності трансплантата сім'яників новонароджених тварин в імунопривілейованому органі – сім'янику дорослої тварини, з виживаністю в неімунопривілейованому місці трансплантації – під нирковою капсулою (НК). Нами була оцінена можливість сім'яника як місця для трансплантації, здатного продовжувати виживаність донорського органу.

Найбільш часті гістопатологічні зміни в біоптатах сім'яників з порушенням сперматогенезу можна класифікувати як такі: Сертолі-клітинний синдром (при якому відсутні гермінативні клітини), премейотичний арешт (при якому гермінативний епітелій представлений тільки сперматогоніями) і арешт на рівні мейотичних клітин. Тому в роботі також була оцінена можливість сім'яників статевонезрілих тварин, як донорського органу, розвиватися в умовах трансплантації і виробляти генерації сперматозоїдів.

Мета представленої роботи – дослідити виживаність трансплантованих сім'яників новонароджених мишей при органній алотрансплантації дорослим тваринам під НК або всередину сім'яника (інтратестикулярно).

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні тварини

Всі тварини були вирощені у віварії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини. Експерименти були проведені з використанням 48 дорослих мишей відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених І Національним конгресом з біоетики та погодженими з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Отримання донорських органів для трансплантації

Для отримання донорських органів новонароджених мишей тварин віком до 1 доби присипляли за допомогою кетамін-ксилазинової ін'єкції (кетамін – 7,5 мг/100 г, ксилазин – 1,5 мг/100 г ваги тварини). Після цього через розріз в черевній порожнині вилучали сім'яники.

Жирова тканина, епідідіміс і сім'явивідна протока акуратно видалялися із сім'яника. Органи негайно поміщали на лід у фосфатний буферний розчин, що містив 100 од/мл пеніциліну, 200 мкг/мл стрептоміцину та 5 мкг/мл амфотерицину В.

Трансплантація донорських органів

Трансплантацію проводили 5–6-місячним, дорослим тваринам під загальною кетамін-ксилазиною анестезією (кетамін – 2,5 мг/100 г, ксилазин – 0,5 мг/100 г ваги тварини). При трансплантації використовували операційний мікроскоп з оптичним збільшенням 12, холодне освітлення операційного поля, мікрохірургічний офтальмологічний інструментарій (скальпель, пінцети, ножиці), голкотримач з хірургічною голкою, анатомічні та хірургічні пінцети, шовний матеріал.

Для інтратестикулярної (ІТ) трансплантації область операційного поля (передню стінку черевної порожнини) обробляли 70%-м етиловим спиртом. Через розріз в черевній порожнині лівий сім'яник виводили назовні. За допомогою хірургічної голки, акуратно, робили прокол у верхньому полюсі білкової оболонки сім'яника, в місці, де були відсутні великі судини. Через цей прокол в товщу паренхіми сім'яника поміщали два донорських органа. Після цього сім'яник знову повертали в черевну порожнину.

Для трансплантації під НК область операційного поля (передню і ліву стінку черевної порожнини) обробляли 70%-м етиловим спиртом. Робили невеликий розріз черевної порожнини близько 1 см над позицією лівої нирки. Ліву нирку виводили назовні. Через невеликий розріз НК сім'яники новонароджених тварин поміщали безпосередньо під капсулу за допомогою офтальмологічного пінцету, для уникнення ризику подальшої втрати донорського органу через розріз. Нирку повертали назад на своє місце в черевній порожнині.

Операційну порожнину після обох типів трансплантацій промивали 0,9%-м розчином NaCl, що містив 100 од/мл пеніциліну і 200 мкг/мл стрептоміцину. Пошарово зшивали краї рани черевної порожнини. Місце розрізу обробляли 3% -м спиртовим розчином йоду.

Після закінчення терміну експерименту тварин умертвляли за допомогою ін'єкції кетаміну та ксилазину (кетамін – 7,5 мг/100 г, ксилазин – 1,5 мг/100 г ваги тварини).

Гістологічний аналіз

Сім'яники та нирки з трансплантатом були фіксовані в 10%-му формаліні протягом 2-х діб. Після занурення органів у парафін були зроблені їх серійні зрізи з трансплантатом (і без нього) товщиною близько 5 мкм і забарвлені гематоксилином Маєра та еозином (ГЕ). Ступінь запалення на зрізах трансплантатів була оцінена за шкалою від 0 до 5. Ступінь 0 – запалення відсутнє; ступінь 1 – випадкові осередки лімфоцитарної інфільтрації; ступінь 2 – множинні осередки лімфоцитарної інфільтрації, поєднані з деякою деструкцією сім'яних каналців; ступінь 3 – злиття осередків лімфоцитарної інфільтрації; ступінь 4 – злиття множинних осередків лімфоцитарної інфільтрації, що призводить до формування великого ареалу інфільтрату; ступінь 5 – лімфотична інфільтрація і/або некроз всієї тестикулярної тканини. Дані представлені у вигляді середнього значення. Було досліджено функціональний розвиток донорських тканин, який оцінювався за наявністю найбільш розвинутих генерацій сперматозоїдів (сперматогоній, сперматоцитів і сперматид/сперматозоїдів).

Результати

Гістологічний стан донорської тканини і здатність клітин диференціюватися було оцінено на різних етапах трансплантації. На рис. А показана гістологічна структура сім'яників новонароджених тварин перед трансплантацією. У базальному шарі характерною була наявність сперматогоній і підтримуючих клітин (примітивні клітини Сертолі). У центрі каналців були помічені поодинокі

гоноцити/просперматогонії. Між канальцями розташований широкий інтерстиційний шар, який сформований, головним чином, рихлою сполучною тканиною. Клітини Лейдига залишалися незрілими.

Аналіз трансплантата через 15 днів після операції.

Через 15 днів після ІТ трансплантації в сім'яних канальцях спостерігалася значне збільшення найбільш просунутих генерацій гермінативних клітин (рис. Б). Базальний відділ характеризувався наявністю зрілих сперматогоній типу А і клітин Сертолі. Наявність пахітенових сперматоцитів в центрі канальця вказує на вступ клітин в ранні стадії мейозу. У деяких канальцях спостерігалася формування адлюмінального відділу. Відзначено потоншення інтерстицію у порівнянні з сім'яником перед трансплантацією, яке більш характерно для статевозрілого організму. Кластери клітин Лейдига розташовувалися між сім'яними канальцями.

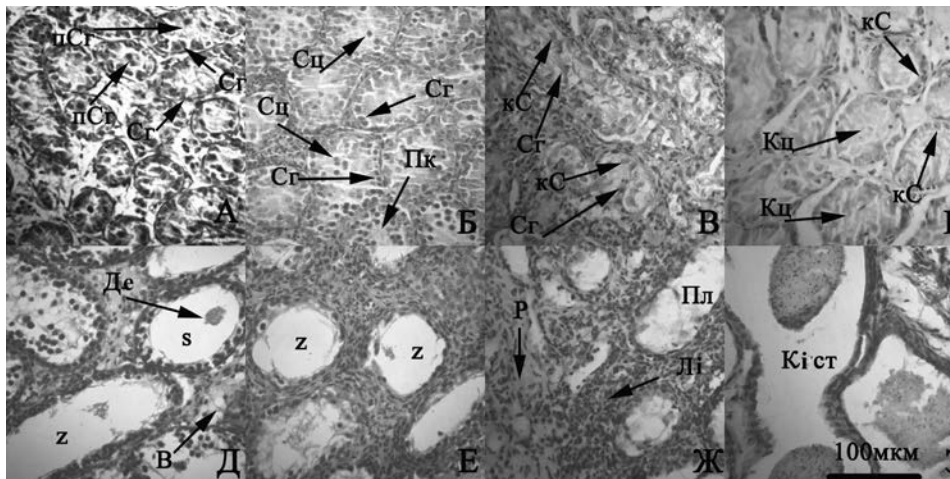


Рис. Сім'яники новонароджених мишей на різних етапах трансплантації:

А – сім'яник новонародженої тварини перед трансплантацією. Показані сперматогонії (Сг), розташовані на базальній мембрані, і просперматогонії (Псг). Б – ІТ трансплантат через 15 днів. Показані сперматогонії типу А (Сг), сперматоцити (Сц), формування просвіту канальця (Пк). В – ІТ трансплантат через 30 днів. Показані клітини Сертолі (кС) і сперматогонії (Сг). Г – ІТ трансплантат через 60 днів. Показані кальцифікація сім'яних канальців (КЦ) і клітини Сертолі (Кс). Д – трансплантат під НК через 15 днів. Показані канальці, вистелені клітинами Сертолі (s), залишки канальців з повною загибеллю гермінативного епітелію (z), десквамація епітелію в просвіт канальця (Де), вакуолі (В). Е – трансплантат під НК через 30 днів. Показані залишки канальців з повною загибеллю гермінативного епітелію (z). Ж і З – трансплантат під НК через 60 днів. Показані генералізовані осередки лімфоцитарного інфільтрату (Лі), формування рубця (Р), невеликі порожнини на місці сім'яних канальців (Пл), кісти (Кіст).

Ступінь запальної реакції в ІТ трансплантаті була оцінена як 0,3. Навколо деяких сім'яних канальців спостерігалися скупчення епітеліоїдних клітин. Діаметр канальців незначно збільшився.

Зовсім інша реакція спостерігалася на 15-ту добу при трансплантації під НК (рис. Д). Сім'яні канальці трансплантата були складені, в основному, з клітин Сертолі або клітин Сертолі із залишками сперматогоній. Спостерігалася десквамація гермінативного епітелію всередину сім'яного канальця, збільшення просвіту канальця за рахунок загибелі клітин гермінативного епітелію. У деяких випадках відмічено проникнення лімфоцитарного інфільтрату всередину сім'яного канальця, повна відсутність клітин гермінативного епітелію і формування свого роду кісти.

У інтерстиційному просторі повсюдно формувалися незначні осередки лімфоцитарної інфільтрації. Потовщення простору відбувалося за рахунок присутності інфільтрату, епітеліоїдних клітин, накопичення рідини і формування сполучної тканини. Як усередині сім'яного канальця, так і в інтерстиційному просторі виявлялися наслідки некрозу тканин і формування вакуолей. Ступінь запальної реакції в трансплантаті в даному випадку була оцінена як 2,2.

Аналіз трансплантата через 30 днів після операції.

На 30-ту добу після ІТ трансплантації відзначено відсутність клітин, що вступають у мейоз (рис. В), а також зменшення кількості як сперматоцитів 1-го порядку, так і сперматогоній. Сім'яні каналці сформовані з клітин Сертолі і сперматогоній. При цьому просвіт каналців був заповнений клітинами, люмінальний простір був відсутній. Інтерстиційний простір збільшувався за рахунок появи незначних осередків інфільтрації, епітеліоїдних клітин і фібробластів/фіброцитів. Ступінь запальної реакції в трансплантаті була оцінена як 1,1.

У трансплантаті під НК відмічалось повсюдне зростання осередків масованої лімфоцитарної інфільтрації, проникнення лімфоцитарного інфільтрату всередину каналців, присутність епітеліоїдних клітин і майже повна загибель клітин донора (рис. Е). Лише окремі сім'яні каналці містили тільки клітини Сертолі. Ступінь запальної реакції в трансплантаті була оцінена як 4,2.

Аналіз трансплантата через 60 діб після операції

На 60-ту добу після ІТ трансплантації сім'яні каналці донора склалися в основному з клітин Сертолі (рис. Г). Просвіт каналців був заповнений кальцифікатом. У інтерстиційному просторі переважали клітини фібробластичного ряду, що формували рубець. Осередків лімфоцитарної інфільтрації майже не спостерігалось. Ступінь запальної реакції в трансплантаті була оцінена як 0,2.

У трансплантаті під НК на 60-ту добу в донорській тканині були виявлені генералізовані вогнища лімфоцитарного інфільтрату і вогнища повністю сформованого рубця зі сполучної тканини (рис. Ж).

На місці сім'яних каналців, серед лімфоцитарного інфільтрату і сполучної тканини, спостерігалися як невеликі, так і значні кістоподібні порожнини (рис. З), що були вистелені сполучною тканиною. Донорські клітини і тканини були відсутні. Ступінь запальної реакції в трансплантаті була оцінена як 5,0.

Обговорення

Алотрансплантат ініціює розвиток реакції імунологічного відторгнення, яке за своєю клінічною картиною поділяють на надгостре, гостре і хронічне. Механізм надгострого відторгнення обумовлений пресенсибілізацією організму реципієнта до антигенів донора. Цей механізм зазвичай реалізується в перші хвилини або години після операції. У нашій роботі трансплантат мав більш тривалий період виживання, тому в нашій моделі такий механізм не міг бути реалізований.

У патогенезі гострого відторгнення, як правило, основну роль відіграє клітинна ланка імунітету. За допомогою неї відбуваються процеси розпізнавання антигенів головного комплексу гістосумісності (у мишей H2) і знищення чужорідної клітини-мішені. Залежно від шляху представлення антигену, цей процес може реалізуватися як на 1, так і на 2 або 3 тижні, але не більше. Якщо він не реалізується, то можна говорити про хронічний механізм, в якому головну участь беруть гуморальні антитіла до головного комплексу гістосумісності. Як правило, цей механізм реалізується протягом декількох місяців або років після трансплантації. Для наших моделей трансплантації найбільш характерні два останні механізми. При порівнянні двох типів трансплантацій спостерігалися принципово різні механізми відторгнення і шляхи розвитку донорської тканини.

Через 15 діб після операції в ІТ трансплантаті показано формування структури сім'яника, подібної дорослому організму. Широко відомо, що тестостерон, який дифундує в сім'яні каналці, необхідний для індукції сперматогенезу, стимулювання поділу сперматогоніїв, мейозу сперматоцитів в пубертатному періоді та його підтримки в зрілому віці. Формування більш компактного інтерстиційного простору, а також сім'яного каналця, характерного для більш зрілих тварин, вказує на наявність стероїдогенних клітин саме в інтерстиційному просторі трансплантата. Після трансплантації в ІТ трансплантаті були показані фази поділу та росту сперматогенних клітин. Наявність пахітенових сперматоцитів підтверджує вступ клітин в стадію мейозу.

Формування просвіту каналців вказує на формування адлюмінального простору, який створює специфічне оточення для сперматогенезу. Процес формування просвіту каналців також залежить від наявності зрілих клітин Сертолі (Cheng et al., 2012). Поява зрілих клітин Лейдіга і Сертолі вказує на включення трансплантата в загальну схему регуляції гормонами гіпофіза і гіпоталамуса реципієнта, а також про цілком сформовані сім'яні каналці, що складаються з перитубулярних міоїдних клітин, зрілих клітин Сертолі і сформованої між ними базальної мембрани. Формування люмінальної порожнини також вказує на наявність гемато-тестикулярного бар'єру, який сформований, головним чином, щільними і десмосомоподібними контактами клітин Сертолі. Вони ізолюють високоімуногенний

компонент трансплантата – гермінативний епітелій – від імунної системи реципієнта (Cheng et al., 2012). Це робить свій внесок у механізм пролонгування виживаності трансплантата.

На 30-ту добу після операції в сім'яних канальцях ІТ трансплантатів, у порівнянні з 15-ою добою, знижувалася загальна кількість сперматоцитів, що свідчить про згасання сперматогенної функції. Значна частина гермінативного епітелію була сформована клітинами Сертолі і сперматогоніями. Збільшення інтерстиційного простору відбувалося, в основному, за рахунок формування сполучної тканини, епітеліюклітин і незначної кількості інфільтрату. Незважаючи на це, до 60-ї доби спостереження сім'яні канальці залишалися, але були сформовані, головним чином, клітинами Сертолі з просвітом, заповненим кальцифікатом. Присутність клітин донора на тлі відсутності клітинного інфільтрату вказує на хронічний характер відторгнення трансплантата і його здатність виживати в організмі реципієнта після ІТ трансплантації тривалий період.

До 15-ої доби у трансплантаті під НК спостерігалось руйнування гермінативного шару стінок сім'яного канальця, що свідчить про нездатність трансплантата до функціонування і розвитку. Наявність великої кількості інфільтрату вказує на те, що при трансплантації під капсулу нирки реакція відторгнення трансплантата йде за гострим шляхом, в якому задіяні механізми як прямого, так і опосередкованого розпізнавання молекул головного комплексу гістосумісності. До 30-ої доби ці процеси наростали. Значно знижувалася кількість канальців, вистелених донорськими клітинами Сертолі. До 60-ої доби проникнення інфільтрату в сім'яні канальці призводило до повної відсутності клітин донора в трансплантаті і формування сполучнотканинного рубця.

Порівняння цих двох місць для трансплантації показує, що місце трансплантації в даній моделі визначає виживаність трансплантата. У роботі (Matoba, Ogura, 2010) була показана реконструкція сім'яних канальців при трансплантації примордіальних гермінативних клітин і гонадальних соматичних клітин під НК. При цьому було показано формування серед трансплантованої тканини ранніх сперматид. Крім того, введення цих сперматид в зрілий ооцит призводило до народження нормального потомства. Таким чином, показана принципова можливість для повноцінного ектопічного сперматогенезу при трансплантації у дорослих лінійних мишей. При алотрансплантації серед нелінійних та/або неімунodefіцитних особин виникає реакція імунологічного відторгнення, яка створює перешкоди для розвитку донорських клітин.

Відомо, що сім'яник як сайт трансплантації має здатність пролонгувати виживаність донорських тканин (Head et al., 1983). В основі цієї властивості, мабуть, лежать механізми встановлення толерантності стосовно аутоантигенів, які продукуються власними гермінативними клітинами в процесі розвитку (Wakabayashi et al., 1997). Здатність сім'яника пролонгувати виживаність трансплантата забезпечується множинними факторами: фізіологічною структурою органа, місцевим імуносупресивним оточенням і системною імунологічною толерантністю (Meinhardt, Hedger, 2011).

Про роль гемато-тестикулярного бар'єра у обмеженні гермінативних клітин від імунної системи господаря нами було сказано вище. Однак гемато-тестикулярний бар'єр не забезпечує повної ізоляції антигенів як в нормальних умовах, так і в умовах трансплантації, тим більше, що сперматогонії знаходяться із зовнішнього боку бар'єру (Setchell, 1990). Крім того, було показано, що наявність власних антигенів, особливо на певних етапах розвитку, багато в чому забезпечує механізм формування толерантності та імунопривілейованості (Wakabayashi et al., 1997). Встановлено, що гермінативні клітини можуть секретувати різні цитокіни, включаючи ІЛ1 α і ФНО α (De et al., 1993). Було показано, що гермінативні клітини експресують Fas-ліганд, який може запускати апоптоз лімфоцитів (D'Alessio et al., 2001). Однак, цього механізму недостатньо як для забезпечення толерантності (Filippini et al., 2001), так і для виживання трансплантата сім'яників, особливо, під НК.

При ІТ трансплантації донорська тканина знаходиться у специфічному оточенні інтерстиційного простору реципієнта, яке містить велику кількість імунокомпетентних клітин, що мають специфічні властивості. Наприклад, тестикулярні макрофаги, які є однією з основних клітинних популяцій інтерстиційного простору, мають відносно низькі здібності брати участь у запаленні і високі імуносупресивні властивості в порівнянні з макрофагами з інших тканин (Kern et al., 1995). Макрофаги сім'яників здатні продукувати протизапальні цитокіни (Winnall et al., 2011). Т-лімфоцити також представлені в інтерстиційному просторі переважно CD8+ клітинами. В-лімфоцити в нормі дуже рідкісні. При запальних процесах в сім'яниках їх кількість значно зростає (El-Demiry et al., 1987). Також в сім'яниках показано наявність особливої популяції клітин – CD4+CD25+ регуляторних Т-лімфоцитів, які характеризуються потужними імуносупресивними властивостями, сприяють підтримці та контролю периферичної толерантності (Wheeler et al., 2011). В роботі (Dai et al., 2005; Nasr et al., 2005) була

показана ліквідація CD8+ клітин пам'яті при трансплантації острівців Лангерганса в сім'яник і збільшення кількості CD4+CD25+ регуляторних Т-лімфоцитів в селезінці і лімфатичних вузлах. Це сприяло збільшенню виживаності алотранспланта та не тільки в імунопривілейованому місці трансплантації, що вказує на системний характер формування імунологічної толерантності.

У нашому випадку наявність лімфоцитарного інфільтрату не була чинником, що визначає механізм відторгнення. При ІТ трансплантації не реалізовується клітинний механізм, який характерний для гострого відторгнення. Замість цього реалізовувався один або декілька з описаних вище механізмів імунологічного стримування запалення. Реакція відторгнення переходила в хронічний характер, про що свідчать розвиток транспланта та його тривалі терміни виживання в сім'яниках реципієнта.

Висновки

1. ІТ трансплантація призводить до більш тривалої виживаності донорських тканин в організмі реципієнта у порівнянні з трансплантацією під ПК. При ІТ трансплантації не реалізовується повною мірою клітинний механізм, характерний для гострого відторгнення.

2. Формування в донорському органі гемато-тестикулярного бар'єру і структури тканин, характерної для паренхіми сім'яників більш зрілих тварин, не призводило до повної імуноізоляції донорських антигенів в організмі реципієнта. Наслідком цього був розвиток реакцій імунологічного відторгнення, швидкість яких залежала від місця трансплантації.

3. Сім'яник новонароджених мишей був здатний розвиватися тільки в умовах ІТ алотрансплантації і давати генерації сперматозоїдів до сперматоцитів першого порядку через 15 діб після трансплантації. Подальше наростання реакцій імунологічного відторгнення призводило до деструкції сім'яних канальців. За клінічною картиною механізм відторгнення був хронічний, на що вказує наявність донорських клітин і відсутність осередків лімфоцитарного інфільтрату через 60 діб після трансплантації. Трансплантат під НК не розвивався. Він відторгався за гострим механізмом в перші 2–3 тижні після операції.

Список літератури

- Aponte P.M., Schlatt S., Franca L.R. Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men // *Clinics (Sao Paulo)*. – 2013. – Vol.68. – P. 157–167.
- Chen J.J., Sun Y., Nabel G.J. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L) // *Science*. – 1998. – Vol.282. – P. 1714–1717.
- Cheng C.Y., Mruk D.D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – Vol.64, no 1. – P. 16–64.
- Dai Z., Nasr I.W., Reel M. et al. Impaired recall of CD8 memory T cells in immunologically privileged tissue // *J. Immunol.* – 2005. – Vol.174, no 3. – P. 1165–1170.
- D'Alessio A., Riccioli A., Lauretti P. et al. Testicular FasL is expressed by sperm cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2001. – Vol.98, no 6. – P. 3316–3321.
- De S.K., Chen H.L., Pace J.L. et al. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells // *Endocrinology*. – 1993. – Vol.133, no 1. – P. 389–396.
- Ei-Demiry M.I., Hargreave T.B., Busuttill A. et al. Immunocompetent cells in human testis in health and disease // *Fertil. and Steril.* – 1987. – Vol.48, no 3. – P. 470–479.
- Filippini A., Riccioli A., Padula F. et al. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen // *Hum. Reprod. Update*. – 2001. – Vol.7, no 5. – P. 444–449.
- Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege // *Science*. – 1995. – Vol.270. – P. 1189–1192.
- Head J.R., Neaves W.B., Billingham R.E. Immune privilege in the testis. I. Basic parameters of allograft survival // *Transplantation*. – 1983. – Vol.36, no 4. – P. 423–431.
- Kern S., Robertson S.A., Mau V.J., Maddocks S. Cytokine secretion by macrophages in the rat testis // *Biol. Reprod.* – 1995. – Vol.53, no 6. – P. 1407–1416.
- Li J., Savolainen H., Tan F., Zheng S. Orthotopic testicular transplantation in mice // *Reproduction*. – 2010. – Vol.139, no 2. – P. 447–452.
- Li N., Wang T., Han D. Structural, cellular and molecular aspects of immune privilege in the testis // *Front Immunol.* – 2012. – Vol.152. – P. 1–11.

Matoba S., Ogura A. Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult mice // *Biol. Reprod.* – 2011. – Vol.84, no 4. – P. 631–638.

Meinhardt A., Hedger M.P. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2011. – Vol.335, no 1. – P. 60–68.

Nasr I.W., Wang Y., Gao G. et al. Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2005. – Vol.174, no 10. – P. 6161–6168.

Setchell B.P. The testis and tissue transplantation: Historical aspects // *J. Reprod. Immunol.* – 1990. – Vol.18. – P. 1–8.

Simpson E.A. historical perspective on immunological privilege // *Immunol Rev.* – 2006. – Vol.213. – P. 12–22.

Wakabayashi A., Eishi Y., Nakamura K. Regulation of experimental autoimmune orchitis by the presence or absence of testicular antigens during immunological development in SCID mice reconstituted with fetal liver cells // *Immunology.* – 1997. – Vol.92, no 1. – P. 84–90.

Wheeler K., Tardif S., Rival C. et al. Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol.108, no 18. – P. 7511–7516.

Winnall W.R., Muir J.A., Hedger M.P. Rat resident testicular macrophages have an alternatively activated phenotype and constitutively produce interleukin-10 in vitro // *J. Leukoc. Biol.* – 2011. – Vol.90, no 1. – P. 133–143.

Представлено: К.В.Міленцьєва / Presented by: K.V.Milentyeva

Рецензент: Ю.Г.Кот / Reviewer: Yu.G.Kot

Подано до редакції / Received: 27.01.2016

УДК: 612.11:577.352.462

Гематокрит как критерий оценки реакции эритроцитов на изменение осмоляльности среды

Е.А.Семіонова¹, Е.Е.Ніпот², Н.В.Орлова², Н.М.Шпакова²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)
semionovakate@gmail.com

Проведено сравнительное изучение изменения гематокрита млекопитающих (человек, лошадь, бык, кролик, крыса) в зависимости от концентрации NaCl в среде при 0 и 37°C. Показано нелинейное изменение показателей гематокрита с ростом концентрации NaCl. При этом минимумы гематокритных зависимостей наблюдаются в средах: 0,4 моль/л NaCl – для эритроцитов человека и лошади, 0,3–0,4 моль/л NaCl – крысы, 0,4–0,6 моль/л NaCl – кролика, как при 37°C, так и при 0°C. Клетки быка, в отличие от эритроцитов других исследуемых млекопитающих, демонстрируют минимальное значение гематокрита при более высокой концентрации NaCl – 1,0 моль/л только при 37°C.

Ключевые слова: эритроциты млекопитающих, гематокрит, осмоляльность, объём клеток, форма клеток.

Гематокрит як критерій оцінювання реакції еритроцитів на зміну осмоляльності середовища

К.А.Семіонова, О.Є.Ніпот, Н.В.Орлова, Н.М.Шпакова

Проведено порівняльне вивчення зміни гематокриту ссавців (людина, кінь, бик, кролик, щур) залежно від концентрації NaCl в середовищі при 0 і 37°C. Показана нелінійна зміна показників гематокриту із зростанням концентрації NaCl. При цьому мінімуми гематокритних залежностей спостерігаються в середовищах: 0,4 моль/л NaCl – для еритроцитів людини і коня, 0,3–0,4 моль/л NaCl – щура, 0,4–0,6 моль/л NaCl – кролика, як при 37°C, так і при 0°C. Клітини бика, на відміну від еритроцитів інших досліджуваних ссавців, демонструють мінімальне значення гематокриту при більш високій концентрації NaCl – 1,0 моль/л тільки при 37°C.

Ключові слова: еритроцити ссавців, гематокрит, осмоляльність, об'єм клітин, форма клітин.

Hematocrit as assessment criterion of erythrocyte response to the change in the medium osmolality

E.A.Semionova, Ye.E.Nipot, N.V.Orlova, N.M.Shpakova

The change in hematocrit of mammals (human, horse, bull, rabbit, rat), depending on NaCl concentration in the medium at 0 and 37°C has been comparatively studied. Non-linear change in hematocrit with increasing concentrations of NaCl has been demonstrated. Herewith the minimums of hematocrit dependencies have been observed in the media: 0.4 mol/l NaCl – for human and horse erythrocytes, 0.3–0.4 mol/l NaCl – for rat's ones, 0.4–0.6 mol/l NaCl – for rabbit's both at 37 and at 0°C. Bovine cells unlike the erythrocytes of other mammals studied have shown a minimal hematocrit value at higher NaCl concentrations – 1.0 mol/l at 37°C only.

Key words: mammalian erythrocytes, hematocrit, osmolality, cell volume, cell shape.

Введение

Клетки на протяжении своего жизненного цикла подвергаются воздействию различных факторов, таких как изменение температуры, pH, осмоляльности окружающей среды. Изучение особенностей их реакции на действие стрессовых факторов *in vitro* позволяет понять естественные адаптационные механизмы, разработать подходы изменения устойчивости клеток с целью повышения их жизнеспособности в неблагоприятных условиях.

Одним из стрессовых факторов, действующих на клетку, является повышенная осмоляльность среды (Шпакова и др., 2015). В то время как почечная гиперосмолярность является хорошо изученным явлением, исследования последних лет свидетельствуют о том, что стресс, который испытывают многие непочечные ткани в условиях повышенной осмолярности, может вносить

существенный вклад в инициацию и развитие патологических состояний организма (Brockner et al., 2012; McManus et al., 1995). Как предполагается в работах (Rybka, Mistrík, 2015; Tan et al., 2010), повышение осмолярности плазмы, наблюдаемое при развитии ряда заболеваний, таких как диабет и почечная недостаточность, препятствует нормальному функционированию клеток крови. В частности, в указанных условиях происходит изменение механических свойств мембран эритроцитов, что снижает их способность к деформации и, как следствие, к переносу кислорода к тканям.

Для того чтобы оценить общее состояние эритроцитов после воздействия стресса, определяют наиболее важные их параметры: объем, форму, физико-химические характеристики мембраны. Часто при исследовании используют комплексные характеристики, отражающие изменение сразу нескольких показателей, например гематокрит. Понятие «гематокрит» изначально было введено в медицинской практике как часть объема крови, приходящаяся на долю форменных элементов крови. Затем было внесено уточнение, и гематокрит связывали с объемным содержанием эритроцитов в крови. В научно-исследовательских работах под гематокритом понимают объемное содержание эритроцитов, поэтому в качестве синонима используют термин «относительный объем» клеток (Методы..., 2004). На величину гематокрита могут влиять особенности морфологии и упаковки эритроцитов.

Целью работы было сравнительное изучение изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих (человек, лошадь, бык, кролик, крыса) в зависимости от концентрации NaCl в среде при 0 и 37°C.

Объекты и методы исследования

Для исследования использовали эритроциты, полученные из донорской крови человека, быка, лошади, кролика и крысы, заготовленной на гемоконсерванте «Глюгицир» (Биофарма, Украина). Кровь человека была предоставлена Харьковским областным центром службы крови; кровь быка и лошади – Харьковской государственной зооветеринарной академией, кролика и крысы – виварием Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

После удаления плазмы эритроциты трижды отмывали путем центрифугирования (центрифуга ОПН-3У4.2 (Кыргызстан), 3000 об/мин, 3 мин) в 10-кратном объеме физиологического раствора (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4). Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли аспирацией. Эритроциты хранили в виде плотного осадка не более 4 ч при температуре 0°C. Все среды, используемые в работе, готовили на 0,01 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4. Осмоляльность растворов контролировали криоскопическим методом с использованием осмометра ОМКА-1Ц-01 (Украина).

Измерение величины гематокрита суспензии эритроцитов проводили по микрогематокритному методу (Методы..., 2004) с помощью гематокритных капилляров (Radiometer, Denmark) и счётной линейки Janetsky (Germany). Стандартный гематокритный капилляр заполняли суспензией исследуемых эритроцитов на 7/8 высоты капилляра. Исходная суспензия была приготовлена в результате смешивания осадка эритроцитов и солевого раствора в отношении 1:4. После этого капилляры центрифугировали в течение 5 мин (микрогематокритная центрифуга МГЦ-8) со скоростью 8000 об/мин. Относительный объем эритроцитов (гематокрит) вычисляли, исходя из общей высоты столба жидкости в капилляре и высоты столба осевших эритроцитов. Уровень гемолиза эритроцитов, определяемый спекрофотометрическим методом (длина волны 543 нм), не превышал 1%.

В работе были использованы реактивы отечественного производства квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.».

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы «Statistica» (версия 6.0). Экспериментальные данные представлены как среднее арифметическое значение количественных показателей (M) ± стандартная ошибка среднего арифметического (m). Количество повторений в серии эксперимента была не менее 8 в двух параллельных пробах. Для проверки совпадения распределения исследуемых количественных показателей в группах с нормальным распределением использовали критерий Шапиро-Уилки. При нормальном распределении

исследуемых числовых показателей статистическую значимость различий проверяли с помощью критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В плазме эритроциты находятся в условиях изотонии, т.е. внеклеточная концентрация растворенных веществ равна внутриклеточной. В том случае, когда внеклеточная концентрация веществ превышает внутриклеточную, эритроциты находятся в гипертонических условиях. В работах соответствующего профиля часто используют термины «осмолярность» и «осмоляльность». Осмолярность представляет собой сумму концентраций всех кинетически активных частиц в 1 л раствора, в то время как осмоляльность – концентрации тех же частиц, но растворенных в 1 кг воды. Эти величины очень близки, если молекулы растворены в чистой воде при тех концентрациях, которые встречаются в биологических жидкостях. Поскольку в нашей работе концентрации растворов контролировали методом осмометрии, который дает информацию о концентрации частиц в 1 кг растворителя, мы предпочитаем использовать термин «осмоляльность».

Эритроциты человека и животных инкубировали в гипертонических средах, содержащих разные концентрации хлорида натрия, при 37 и 0°C, после чего измеряли их гематокрит. Контролем являлся гематокрит клеток, находящихся в изотонических условиях (0,15 моль/л NaCl) при 37°C.

На рис.1 представлены данные, отражающие изменение гематокрита эритроцитов млекопитающих при варьировании концентрации NaCl. Эритроциты человека демонстрируют нелинейную зависимость гематокрита от концентрации соли в среде предварительной инкубации. Повышение концентрации NaCl до 0,4 моль/л приводит к снижению величины гематокрита при 37 и 0°C, которое более выражено в последнем случае (при низкой температуре). При последующем повышении концентрации соли в среде наблюдается увеличение уровня гематокрита при обоих температурных режимах.

Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что характер изменения гематокрита эритроцитов лошади, крысы и кролика в общих чертах напоминает особенности изменения гематокрита эритроцитов человека. При 37 и 0°C с ростом осмоляльности среды наблюдается снижение величины гематокрита эритроцитов животных, а затем его повышение. Минимальное значение гематокрита эритроцитов крысы, лошади и кролика регистрируется в средах, содержащих 0,3–0,4 моль/л, 0,4 моль/л и 0,4–0,6 моль/л NaCl, соответственно, при обоих температурных режимах.

Сравнительный анализ влияния температуры на минимальную величину гематокрита эритроцитов млекопитающих показал, что для эритроцитов человека и кролика значения гематокрита при 0°C ниже, чем при 37°C, в то время как для клеток лошади наблюдается обратная зависимость. Для эритроцитов крысы влияние температуры на уровень минимального гематокрита не выявлено. Можно предположить, что видовые особенности строения и состава мембран, функционирования транспортных систем (Benga, 2013; Vogner et al., 2002; Liu et al., 2011; Matei et al., 2000; Wessels, Veerkamp, 1973) будут определять способность клеток к изменению объема и степени деформации при варьировании температуры окружающей среды.

Для эритроцитов быка характер изменения гематокрита в слабо и умеренно гипертонических средах при 37°C подчиняется ранее выявленной закономерности для клеток человека, лошади, крысы и кролика: наблюдается снижение величины гематокрита с последующим его повышением. Однако имеется несколько отличий. Во-первых, минимальное значение гематокрита эритроцитов быка наблюдается в среде с более высокой концентрацией соли (1,0 моль/л NaCl, осмоляльность 1760 мосмоль/кг), во-вторых, последующее повышение гематокрита в средах с более высоким значением осмоляльности выражено в меньшей степени по сравнению с клетками других млекопитающих. Следует отметить, что изменение гематокрита эритроцитов быка в среде, содержащей 2,0 моль/л NaCl, статистически значимо по сравнению с величиной гематокрита в 1,0 моль/л NaCl ($p < 0,05$). При 0°C с увеличением концентрации NaCl в среде до 0,4 моль/л и выше 1,0 моль/л наблюдается снижение значений гематокрита эритроцитов быка, т.е. динамика гематокрита эритроцитов в гипертонических средах при низкой температуре несколько отличается от таковой при 37°C. Следует отметить, что при низкой температуре (0°C) в среде, содержащей 1,0 моль/л NaCl, значение гематокрита эритроцитов быка статистически выше, чем при 37°C, что напоминает особенности температурной зависимости гематокрита клеток лошади.

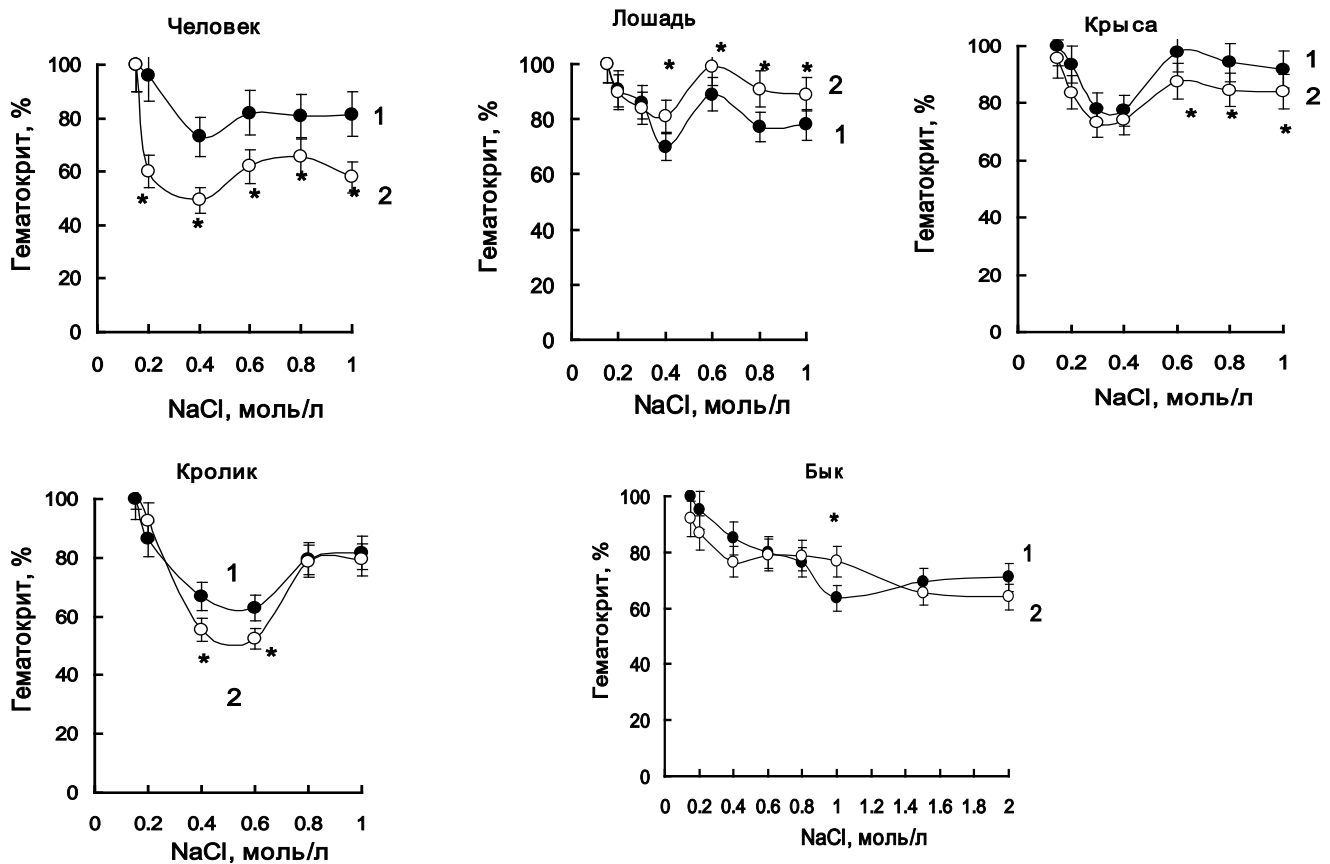


Рис. 1. Зависимость гематокрита эритроцитов млекопитающих от концентрации NaCl в среде при температуре 37 (1) и 0°C (2). За 100% принимали гематокрит клеток в 0,15 моль/л NaCl при 37°C

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с показателями гематокрита клеток при 37°C ($p < 0,05$), количество наблюдений в каждой группе – 8.

Обсуждение

При увеличении концентрации NaCl в окружающей среде выше изотонической происходит отток воды из клетки и изменение её объёма. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению значений гематокрита, что мы и наблюдаем для эритроцитов всех исследуемых видов млекопитающих (рис. 1). Если для эритроцитов человека отмечается наиболее резкое снижение гематокрита при повышении концентрации соли в среде, то для клеток быка оно наименее выражено. Можно предположить, что степень и скорость снижения этого показателя будут определяться способностью клеток к изменению объёма. Одним из важных параметров, оказывающих влияние на объёмный ответ клетки, является соотношение количества связанной и свободной воды (Cameron et al., 1997). При помещении эритроцитов в гипертоническую среду, в первую очередь, будет удаляться свободная вода, а затем – связанная (Cameron et al., 1997). Сравнительный анализ эритроцитов человека и быка показал, что клетки быка содержат меньше свободной воды и больше связанной воды по сравнению с эритроцитами человека (Vogner et al., 1998), что может обуславливать выявленные особенности изменения гематокрита эритроцитов быка и человека в условиях гипертонии.

Гематокрит является интегральным показателем эритроцитов, значение которого зависит как от объёма отдельно взятых клеток, их морфологических характеристик, так и особенностей упаковки этих клеток, т.е. их взаимного расположения.

В работе, в которой измерение объёма клетки проводили с помощью электронного счетчика частиц (Zhao et al., 2004), показано значительное изменение объёма клетки в более широком концентрационном диапазоне по сравнению с нашими данными. Если в нашей работе минимальное

значение гематокрита регистрируется в средах, содержащих фактически 0,3–0,4 моль/л NaCl, что соответствует осмоляльности 550–700 мосмоль/кг (рис. 1), то Zhao и соавт. (Zhao et al., 2004) показали резкое уменьшение объема клетки человека в более широком диапазоне вплоть до 1350 мосмоль/кг. Таким образом, выявленные изменения гематокрита эритроцитов млекопитающих не являются отражением только объемных изменений клеток.

Одной из важных составляющих показателя гематокрита являются морфологические характеристики клетки. Выявленное минимальное значение гематокрита эритроцитов млекопитающих в средах с концентрацией NaCl порядка 0,4 моль/л может быть обусловлено преобладанием эхиноцитарных форм эритроцитов. В пользу этого свидетельствуют данные работы (Hayashi et al., 2009), в которой установлено, что эхиноцитарные формы эритроцитов кролика демонстрируют меньшие значения гематокрита после центрифугирования по сравнению с дискоцитами.

Из анализа зависимостей гематокрита от концентрации соли в среде видно, что после достижения минимальных значений гематокрита наблюдается повышение величины этого показателя для эритроцитов человека, лошади и крысы в среде, содержащей 0,6 моль/л NaCl, а для клеток кролика – в 0,8 моль/л NaCl. Наблюдаемое увеличение гематокрита не обусловлено ростом объема отдельно взятых эритроцитов, поскольку в указанных средах, наоборот, отмечается снижение объема клеток (Zhao et al., 2004). Возможно, морфологические особенности эритроцитов млекопитающих вносят вклад в указанный эффект. Ранее методом световой микроскопии (Александрова, 2011) были исследованы морфологические особенности эритроцитов млекопитающих (человек, лошадь, крыса, кролик и бык) в гипертонических средах (0,4 моль/л и 0,6 моль/л NaCl). Автором было показано практически одинаковое изменение формы клеток быка, с одной стороны, и эритроцитов остальных млекопитающих, с другой, хотя минимальное значение гематокрита эритроцитов указанных млекопитающих и последующее его повышение регистрируется при различных значениях осмоляльности среды (рис. 1). Таким образом, морфологические особенности клеток млекопитающих не вносят определяющий вклад в величину гематокрита. Исходя из вышеизложенного, особенности упаковки эритроцитов, которые не зависят от морфологических характеристик клеток, а определяются модификацией физико-химических свойств эритроцитов, влияют на величину гематокрита. Так, увеличение жесткости мембраны с ростом осмоляльности среды (Tan et al., 2010) может оказывать влияние на характер упаковки клеток. Кроме того, в гипертонических солевых средах внеклеточные катионы Na^+ могут входить в клетки по концентрационному градиенту (Єршова та ін., 2014), а внутриклеточные катионы K^+ покидают их (Шпакова та ін., 2008), что свидетельствует об изменении барьерных свойств эритроцитарной мембраны и ее модификации.

В заключение следует отметить, что в работе выявлены общие закономерности и установлены видовые особенности реакции эритроцитов разных видов млекопитающих (оцениваемой по изменению гематокрита) на повышение осмоляльности среды. Общим для всех исследуемых эритроцитов млекопитающих является характер зависимости гематокрита от концентрации соли в среде. Видовые особенности эритроцитов млекопитающих проявляются в зависимости минимального гематокрита клеток от температуры и концентрации хлорида натрия в среде.

Список литературы

- Александрова Д.І. Вплив початкових осмотичних та температурних умов на стійкість еритроцитів ссавців до гіпертонічного шоку. Автореф. дис. ... канд. біол. наук / 03.00.19 – кріобіологія. – Харків, 2011. – 20с. /Aleksandrova D.I. Vplyv pochatkovykh osmotychnykh ta temperaturnykh umov na stiykist' erytrotsytiv ssavtsiv do gipertonichnogo shoku. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk / 03.00.19 – kriobiologiya. – Kharkiv, 2011. – 20s./
- Єршова Н.А., Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Єршов С.С. Амфіфіли як інструмент для вивчення гіпертонічного криогемолізу еритроцитів ссавців // Біологія тварин. – 2014. – Т.16, №2. – С. 26–34. /Yershova N.A., Shpakova N.M., Orlova N.V., Yershov S.S. Amfifily yak instrument dlya vyvchennya gipertonichnogo kriogemolizu eritrotsytiv ssavtsiv // Biologiya tvaryn. – 2014. – T.16, №2. – S. 26–34./
- Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник / Ред. И.П.Кондрахин– М.: КолосС, 2004. – 520с. /Metody veterinarnoy klinicheskoy laboratornoy diagnostiki: spravochnik / Red. I.P.Kondrakhin– M.: KolosS, 2004. – 520s./
- Шпакова Н.М., Орлова Н.В., Ершов С.С. и др. Температура и осмолярность как факторы, определяющие устойчивость эритроцитов млекопитающих к гипертоническому шоку // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.3, т.1, №122. – С. 242–245. /Shpakova N.M., Orlova N.V., Yershov S.S. i dr. Temperatura i osmolyarnost' kak faktory, opredelyayushchiye ustoychivost' eritrotsitov mlekopitayushchikh k gipertonicheskomu shoku // Visnyk problem biologiyi i medytsyny. – 2015. – Vyp.3, t.1, №122. – S. 242–245./

- Шпакова Н.М., Єршов С.С., Ніпот О.Є. До питання про можливу кореляцію між виходом іонів K^+ і розвитком гемолітичного пошкодження еритроцитів ссавців в умовах гіпертонічного криогемолізу // *Біологія тварин.* – 2008. – Т.10, № 1–2. – С. 164–170. /Shpakova N.M., Yershov S.S., Nipot O.Ye. Do pytannya pro mozhyvu korelyatsiyu mizh vykhodom ioniv K^+ i rozvytkom gemolitychnogo poskodzhennya erytrotsytyv ssavtsiv v umovakh gipertonichnogo kriogemolizu // *Biologiya tvaryn.* – 2008. – Т.10, № 1–2. – С. 164–170./
- Benga G. Comparative studies of water permeability of red blood cells from humans and over 30 animal species: an overview of 20 years of collaboration with Philip Kuchel // *Eur. Biophys. J.* – 2013. – Vol.42, no 1. – P. 33–46.
- Bogner P., Csutora P., Cameron I.L. et al. Augmented water binding and low cellular water content in erythrocytes of camel and camelids // *Biophys. J.* – 1998. – Vol.75, no 6. – P. 3085–3091.
- Bogner P., Sipos K., Ludány A. et al. Steady-state volumes and metabolism-independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – Vol.31, no 2. – P. 145–152.
- Brocker C., Thompson D.C., Vasiliou V. The role of hyperosmotic stress in inflammation and disease // *Biomol. Concepts.* – 2012. – Vol.3, no 4. – P. 345–364.
- Cameron I.L., Kanal K.M., Keener C.R., Fullerton G.D. A mechanistic view on the non-ideal osmotic and motional behavior of intra cellular water // *Cell Biol. Int.* – 1997. – Vol.21, no 2. – P. 99–113.
- Hayashi Y., Katsumoto Y., Oshige I. et al. The effects of erythrocyte deformability upon hematocrit assessed by the conductance method // *Phys. Med. Biol.* – 2009. – Vol.54, no 8. – P. 2395–2405.
- Liu L., Lei T., Bankir L. et al. Erythrocyte permeability to urea and water: comparative study in rodents, ruminants, carnivores, humans, and birds // *J. Comp. Physiol. B.* – 2011. – Vol. 181, №1. – P. 65–72.
- Matei H., Frentescu L., Benga G. Comparative studies of the protein composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *J. Cell. Mol. Med.* – 2000. – Vol.4, no 4. – P. 270–276.
- McManus M., Churchwell K., Strange K. Regulation of cell volume health and disease // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – Vol.333, no 19. – P. 1260–1266.
- Rybka J., Mistrík J. Hyperosmolar hyperglycemic state // *Vnitr. Lek.* – 2015. – Vol.61, no 5. – P. 451–457.
- Tan Y., Sun D., Wang J., Huang W. Mechanical characterization of human red blood cells under different osmotic conditions by robotic manipulation with optical tweezers // *IEEE Trans Biomed Eng.* – 2010. – Vol.57, no 7. – P. 1816–1825.
- Zhao G., He L., Zhang H. et al. Trapped water of human erythrocytes and its application in cryopreservation // *Biophys. Chem.* – 2004. – Vol.107, no 2. – P. 189–195.
- Wessels J.M.C., Veerkamp J.H. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes III. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol.291, no 1. – P. 190–196.

Представлено: О.В.Шаповалова / Presented by: O.V.Shapovalova

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 17.11.2015

УДК: 547.787.2 + 535.33/34

Апоптоз энтероцитов при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите: исследование методом флуоресцентных зондов
А.С.Ткаченко¹, Е.М.Корниенко², Е.А.Посохов³

¹Харьковский национальный медицинский университет (Харьков, Украина)

²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

³Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт» (Харьков, Украина)

yevgenposokhov@gmail.com

В настоящей работе было проведено исследование состояния липидного бислоя мембран энтероцитов крыс в условиях протекания хронического гастроэнтероколита. Для исследования нами использовались флуоресцентные зонды – орто-гидроксипроизводные оксазола, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами клеток и реагируют на изменения микроокружения. Установлено, что в ходе протекания хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита происходит увеличение гидратированности полярных областей мембран энтероцитов, что свидетельствует об активации апоптоза энтероцитов. Показано, что флуоресцентный зонд (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол) может быть использован в качестве индикатора для детекции апоптоза энтероцитов.

Ключевые слова: энтероциты, биомембрана, каррагинан, флуоресцентный зонд.

Апоптоз ентероцитів при хронічному карагінан-індукованому гастроентероколіті: дослідження методом флуоресцентних зондів
А.С.Ткаченко, Є.М.Корнієнко, Є.О.Посохов

У даній роботі було проведено дослідження стану ліпідного бішару мембран ентероцитів щурів в умовах протікання хронічного гастроентероколіту. Для дослідження нами використовувалися флуоресцентні зонди – орто-гидроксипохідні оксазолу, молекули яких нековалентно зв'язуються з мембранами клітин і реагують на зміни мікрооточення. Встановлено, що в ході протікання хронічного карагінан-індукованого гастроентероколіту відбувається збільшення гідратованості полярних областей мембран ентероцитів, що свідчить про активацію апоптозу ентероцитів. Показано, що флуоресцентний зонд (2-(2'-ОН-феніл)-5-феніл-1,3-оксазол) може бути використаний як індикатор для детекції апоптозу ентероцитів.

Ключові слова: ентероцити, біомембрана, карагінан, флуоресцентний зонд.

Apoptosis of enterocytes in chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis: a study by fluorescent probes
A.S.Tkachenko, Ye.M.Korniyenko, Ye.O.Posokhov

A study of the lipid bilayer of membranes of enterocytes of rats with chronic gastroenterocolitis was performed in this work. For the study we used fluorescent probes – ortho-hydroxy derivatives of oxazole, molecules of which bind non-covalently to the membranes of cells and respond to changes in the microenvironment. It has been found that during the course of chronic carrageenan-induced gastroenterocolitis an increase in hydration of the polar regions of enterocyte membranes occurs. The increase in hydration is attributed to the activation of enterocytes apoptosis. It has been shown that a fluorescent probe (2-(2'-OH-phenyl)-5-phenyl-1,3-oxazole) can be used for the detection of apoptosis of enterocytes.

Key words: enterocytes, biomembrane, carrageenan, fluorescent probe.

Введение

Каррагинан представляет собой высокомолекулярный анионный полимер, который получают путем экстракции из красных морских водорослей (Vorhakar, 2007). Каррагинан выполняет функцию природного гелеобразователя и загустителя в молочных, кондитерских и мясных продуктах. Пищевой каррагинан (пищевая добавка E407) имеет средний молекулярный вес более 100 кДа с небольшим процентом более мелких фрагментов. Данная пищевая добавка не разрушается в пищеварительном тракте и не всасывается. В экспериментальной медицине каррагинан широко применяется для

моделирования воспалительных процессов. Так, в патологической физиологии каррагинан используют для моделирования перитонита, плеврита, артрита и каррагинан-индуцированного отека конечностей у крыс (Morris, 2003). Каррагинан-индуцированное воспаление является острым, неиммунным и легко воспроизводимым. Отек, гипералгезия и эритема развиваются сразу после подкожной инъекции каррагинана и являются результатом действия таких провоспалительных агентов, как брадикинин, гистамин, тахикинины, компоненты системы комплемента, активные формы кислорода и азота (Morris, 2003). Существуют данные об онкогенной трансформации клеток под воздействием каррагинана – авторами найдена положительная корреляция между использованием продуктов с этой добавкой в диете и увеличением риска развития карциномы молочной железы (Tobacman et al., 2001). Известна также модель язвенно-некротического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита (Pricolo et al., 1996).

В связи с этим возникает вопрос о безопасности применения каррагинана в качестве пищевой добавки. В современной литературе нет достоверных данных о влиянии систематического употребления каррагинана ни на организм взрослого человека, ни на организм ребенка, ни на организм плода при наличии данной добавки в рационе питания беременной женщины. В клинике изучение данной проблемы весьма проблематично, поэтому возникает острая необходимость исследования влияния каррагинана на метаболические показатели в условиях экспериментальной модели. В Харьковском национальном медицинском университете на базе модели язвенно-некротического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита разработана модель хронического каррагинанового гастроэнтероколита средней степени тяжести, без язвенно-некротического процесса, путем использования более низких доз данной пищевой добавки (Спосіб моделювання ..., 2012).

В предыдущих публикациях (Жуков, Ткаченко, 2013; Ткаченко и др., 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015) было показано, что при развитии хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита в эндотелии кишечника крыс происходит активация апоптотических процессов. О последнем судили по активации протеинкиназы 1, регулирующей апоптотический сигнал (ASK-1) (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015); активации металлопротеиназы-2 (MMP-2) (Ткаченко и др., 2013); инактивации поли-(АДФ)-рибозы-полимеразы (ПАРП) (Жуков, Ткаченко, 2013; Ткаченко и др., 2013); активации каспазы-3 (Ткаченко и др., 2013); увеличению уровня фрагментации ДНК (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015).

Однако, непосредственное исследование изменений в мембранах энтероцитов, происходящих в результате активации апоптотических процессов, не проводилось.

Целью настоящей работы явилось исследование состояния липидного бислоя мембран энтероцитов крыс в условиях активации апоптотических процессов. Для этого нами использовались флуоресцентные зонды – орто-гидроксипроизводные оксазола, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами клеток и реагируют на изменения микроокружения (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001).

Материалы и методы

Эксперимент проводился на половозрелых крысах-самках линии Вистар, которые содержались в стандартных условиях вивария. Лабораторные животные были разделены на 2 группы. 1-я группа включала животных с экспериментальным хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом, 2-я группа являлась контрольной и состояла из интактных животных. Хронический каррагинан-индуцированный гастроэнтероколит воспроизводили путем свободного доступа животных к 1% раствору каррагинана в питьевой воде. Через месяц после начала приема раствора каррагинана животные выводились из эксперимента путем декапитации. Кишечник извлекался на холоде немедленно после декапитации крыс. Перфузию кишечника проводили при помощи охлажденного физиологического раствора. Эпителиальные клетки отделяли путем соскабливания с внутренней поверхности кишечника анатомическим ножом. Готовили суспензию эпителиальных клеток в трис-HCl буфере (pH 7,4). Для исследования использовали суспензию клеток, соответствующей 56–57 %.

Для исследования состояния липидного бислоя мембран энтероцитов крыс нами использовались флуоресцентные зонды, успешно применявшиеся ранее для исследований биомембран (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001): 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол (зонд **O1O**) и 2-(2'-ОН-фенил)-фенантр(10,11)-1,3-оксазол (зонд **PH7**).

Выбор флуоресцентных зондов **O1O**, **PH7** (орто-гидроксипроизводные 2,5-диарил-1,3-оксазола) для исследования мембран энтероцитов крыс обусловлен тем фактом, что флуоресцентные характеристики этих зондов зависят от физико-химических свойств их микроокружения: от водородосвязывающей способности (т.е. способности к образованию водородных связей), полярности и вязкости микроокружения (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

В настоящей работе были проведены измерения флуоресценции зондов в физиологических растворах, содержащих: (а) энтероциты крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом (опытная группа); (б) энтероциты интактных здоровых животных (контрольный образец).

Флуоресцентные зонды растворяли в ацетонитриле до начальной концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. 10 мкл каждого из соответствующих растворов зонда добавляли к 2 мл суспензии энтероцитов. Конечная концентрация каждого из зондов в суспензии исследуемых мембран – $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л, таким образом, молярное отношение липид/зонд составляло 1000:1. В настоящей работе были проведены измерения флуоресценции зондов **O1O** и **PH7** в физиологических растворах, содержащих энтероциты крыс с хроническим каррагинан-индуцированным гастроэнтероколитом. Измерение спектров флуоресценции производилось на спектрофлуориметре «Hitachi 850» через 1 час после прибавления зондов к раствору клеток. Спектры флуоресценции зондов измеряли в области 340–600 нм при ширине щелей монохроматоров возбуждения и флуоресценции 5 и 5 нм соответственно, и длине волны возбуждения 330 нм.

Результаты исследований

Об активации апоптотических процессов в эндотелии кишечника крыс при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите судили по активации протеинкиназы-1, регулирующей апоптотический сигнал (ASK-1): с 1,77 (контроль) до 4,43 ед/мин. мг белка (гастроэнтероколит 4 недели) (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015); активации металлопротеиназы-2 (MMP-2): с 7,29 (контроль) до 11,43 нг/мл (гастроэнтероколит 4 недели) (Ткаченко и др., 2013); инактивации поли-(АДФ)-рибозы-полимеразы (ПАРП): с 1,37 (контроль) до 0,46 мкмоль/мг белка (гастроэнтероколит 4 недели) (Жуков, Ткаченко, 2013; Ткаченко и др., 2013); активации каспазы-3: с 0,90 (контроль) до 34,57 нг/мл (гастроэнтероколит 4 недели) (Ткаченко и др., 2013); увеличению уровня фрагментации ДНК: с 15,8% (контроль) до 23,9% (гастроэнтероколит 4 недели) (Жуков, Ткаченко, 2013; Gubina-Vakyulyk et al., 2015).

Известно, что в возбужденном состоянии для орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола характерно протекание реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) (рис. 1): гидроксильная группа в орто-положении бокового бензольного кольца – выступает в роли протонодонора, а атом азота оксазольного цикла – в роли протоноакцептора (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002). Результатом реакции ВМФПП является образование фототаутомерной формы (T^*), флуоресцирующей в существенно более длинноволновой области по сравнению с исходной формой (N^*) (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Doroshenko et al., 2000, 2002).

Наличие двухполосной флуоресценции позволяет проводить радиометрические измерения, т.е. использовать отношение интенсивностей флуоресценции фототаутомерной формы (I_{T^*}) и исходной формы (I_{N^*}) в качестве параметра для оценки физико-химических свойств микросреды.

Использование радиометрических флуоресцентных проб позволяет исключить как погрешности измерений, связанные с девиацией концентрации флуоресцентной пробы (например, неравномерным содержанием флуоресцентной пробы в различных мембранах), так и погрешности измерений, связанные с девиацией настроек флуоресцентной техники (девиации интенсивности источника возбуждающего излучения, изменения в фокусировке, изменения в чувствительности фотодетектора и т.д.) (Sharigo, 1995).

Для настоящего исследования были отобраны соединения, различающиеся своей липофильностью (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001). Ожидается, что области локализации отобранных зондов в мембране различны и соответствуют липофильности зондов (рис. 2) (Добрецов, 1989; Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001). Ожидаемая локализация и ориентация **O1O** и **PH7** на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах (Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов,

2011; Посохов и др., 2001) и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в липидных мембранах (Добрецов, 1989): зонд **O10** – в области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к области карбонильных групп; зонд **RH7** – в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи центра бислоя) и в центре липидного бислоя мембран (рис. 2).

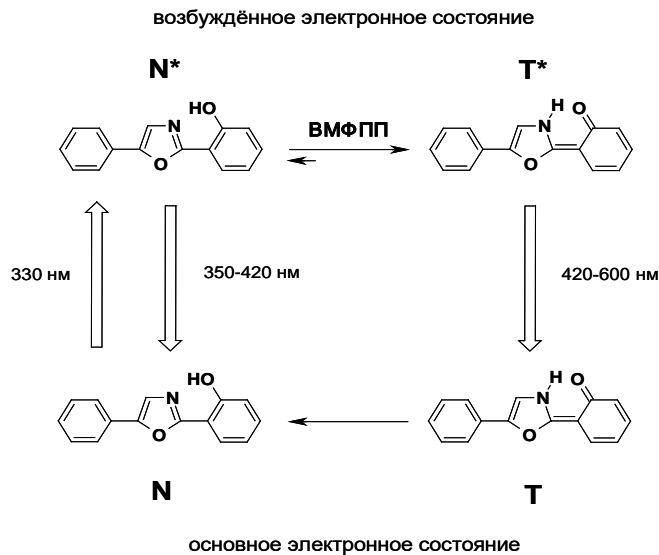


Рис. 1. Схема внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) в 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазоле (зонд O10). Стрелка, направленная вверх, представляет электронное возбуждение, а стрелки, направленные вниз, представляют испускание света (флуоресценцию). Около соответствующих стрелок приведены диапазоны испускания исходной и фототаутомерной форм (нм)

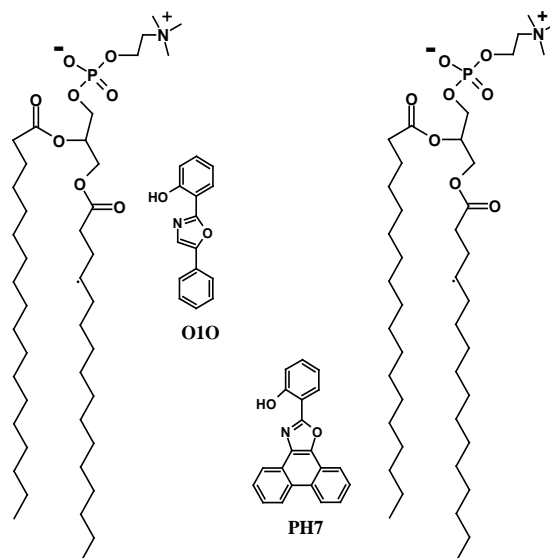


Рис. 2. Ожидаемая локализация и ориентация флуоресцентных зондов O10 и RH7 на основе их флуоресцентных свойств в липидных мембранах (Посохов, 2011; Посохов и др., 2001) и на основе их структурного подобия с флуоресцентными зондами с известной локализацией в

липидных мембранах (Добрецов, 1989). Для обозначения локализации зондов показаны две молекулы фосфатидилхолина из внешнего монослоя

Согласно литературным данным (Fadok et al., 2000; Martin et al., 1995; Matsura et al., 2005; Schlegel et al., 1993; Van den Eijnde, 1997; Zwaal, Schroit, 1997), протекание апоптоза сопровождается следующими изменениями мембраны клетки: (а) теряется липидная асимметрия (Zwaal, Schroit, 1997). Заряженные липиды (фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ)) оказываются во внешнем слое мембраны (Fadok et al., 2000; Martin et al., 1995; Van den Eijnde, 1997; Zwaal, Schroit, 1997); (б) увеличивается негативный заряд внешнего липидного слоя мембраны (Fadok et al., 2000), уменьшается упорядоченность липидов (Schlegel et al., 1993), происходит активация процессов окисления липидов (Matsura et al., 2005). Все вышеупомянутые изменения должны приводить к росту полярности и росту гидратированности мембраны (Disalvo et al., 2008; Ho, Stubbs, 1992; Ho et al., 1995).

На основании свойств используемых нами зондов (Дорошенко и др., 1997; Дорошенко, Посохов, 1999; Набір флуоресцентних зондів ..., 2012; Посохов, 2011; Посохов и др., 2001; Doroshenko et al., 2000, 2002) можно ожидать, что рост полярности и гидратированности мембраны будет приводить к: росту относительной интенсивности флуоресценции исходной (нормальной) формы N^* ; уменьшению относительной интенсивности флуоресценции фототаутомерной формы T^* ; уменьшению соотношения интенсивностей флуоресценции исходной и фототаутомерной форм (I_{T^*}/I_{N^*}).

Таблица 1.
Интенсивность флуоресценции* зондов O10 и PH7 для мембран энтероцитов животных с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов

Образец	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.					
	Зонд O10			Зонд PH7		
	390 нм	470 нм	I_{470}/I_{390}	425 нм	485 нм	I_{485}/I_{425}
контроль	3,7	21,0	5,7	55,4	112,3	2,0
апоптоз	4,0	14,1	3,5	53,9	113,6	2,1

*Примечание: *относительная погрешность значений: (а) интенсивности флуоресценции составляет менее 5%; (б) соотношения I_{T^*}/I_{N^*} составляет менее 10%.*

Действительно, в случае энтероцитов животных с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов наблюдалось заметное уменьшение интенсивности длинноволновой полосы флуоресценции таутомерной формы (I_{T^*}) зонда O10, в то же время, интенсивность полосы флуоресценции нормальной формы (N^*) зонда O10 немного увеличилась (табл. 1, рис. 3). Таким образом, соотношение интенсивностей таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} для зонда O10 уменьшается в условиях активации апоптотических процессов (рис. 4).

Уменьшение интенсивности полосы флуоресценции таутомерной формы (I_{T^*}) и увеличение соотношения I_{T^*}/I_{N^*} зонда O10 свидетельствует об увеличении полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения этого зонда в мембранах энтероцитов крыс с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов. Такое увеличение полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения зонда O10 указывает на увеличение гидратированности микроокружения этого зонда в мембранах энтероцитов животных экспериментальной группы. Наблюдаемое увеличение гидратированности области локализации зонда O10, т.е. полярных областей мембраны, свидетельствует о том, что в ходе протекания хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита происходит активация апоптоза энтероцитов.

В то же время, в случае зонда PH7 не наблюдалось заметных изменений его флуоресцентных параметров в мембранах энтероцитов крыс с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов (табл. 1). Отсутствие изменений в области локализации зонда PH7 (т.е. в более гидрофобных областях липидного бислоя) объясняется тем, что, по-видимому, в ходе активации апоптоза энтероцитов не происходит значительного изменения гидратированности гидрофобных областей липидного бислоя.

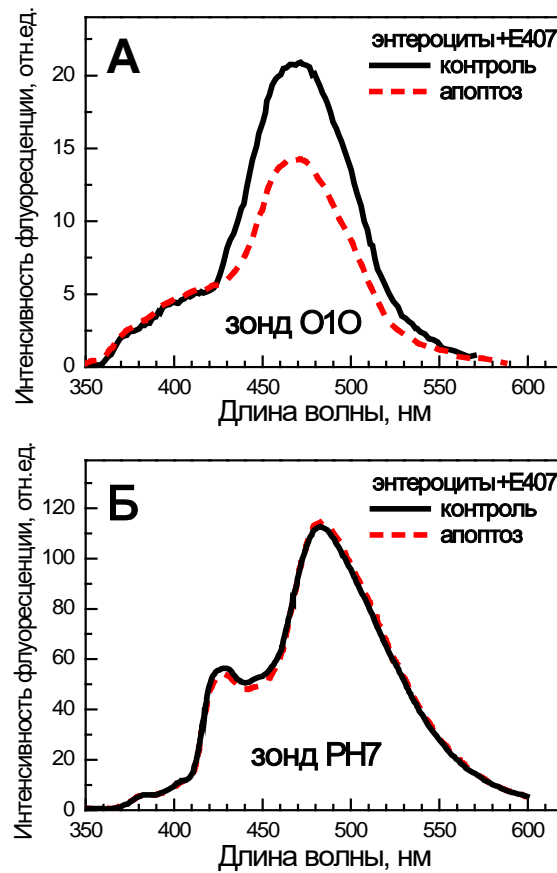


Рис. 3. Спектры флуоресценции зондов O10 (А) и RH7 (Б) в растворах, содержащих энтероциты: (а) контрольные (сплошная линия); (б) животных с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов (пунктирная линия)

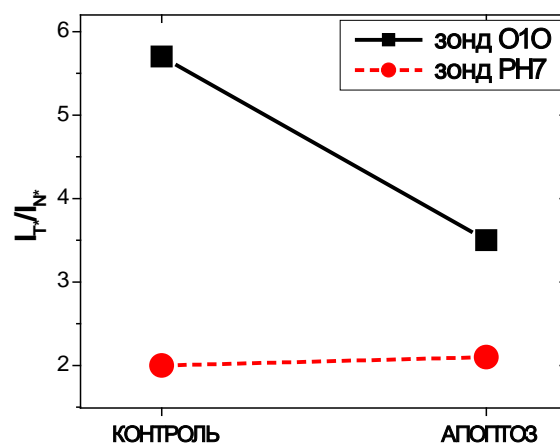


Рис. 4. Соотношение интенсивностей таутомерной и исходной формы I_T/I_N для зондов O10 (квадраты) и RH7 (круги) в мембранах энтероцитов

Таким образом, показано, что в мембранах энтероцитов крыс с каррагинановым гастроэнтероколитом в условиях активации апоптотических процессов происходит увеличение гидратированности области локализации зонда **O10**, т.е. достаточно полярных областей мембраны: предположительно, области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), области карбонильных групп фосфолипидов и области жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к области карбонильных групп. Наблюдаемое изменение гидратации полярных областей мембраны отнесено к активации апоптоза энтероцитов в ходе хронического гастроэнтероколита. В то же время, в условиях активации апоптотических процессов не выявлено изменений в области локализации зонда **PH7**, т.е. в более гидрофобных областях мембран энтероцитов: предположительно, в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи центра бислоя) и в центре липидного бислоя мембран.

Выводы

1. Установлено, что в ходе протекания хронического каррагинан-индуцированного гастроэнтероколита происходит увеличение гидратированности полярных областей мембран энтероцитов, что свидетельствует об активации апоптоза энтероцитов.
2. Показано, что флуоресцентный зонд (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол) может быть использован в качестве индикатора для детекции апоптоза энтероцитов.

Список литературы

- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277с. /Dobretsov G.Ye. Fluorescentnyye zondy v issledovanii kletok, membran i lipoproteinov. – M.: Nauka, 1989. – 277s./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А., Шершуков В.М. и др. Реакция фотопереноса протона в возбужденном состоянии в ряду орто-окси-производных 2,5-диарилксазола // Химия высоких энергий. – 1997. – Т.31, №6. – С. 428–435. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A., Shershukov V.M. i dr. Reaktsiya fotoperenosa protona v vzbuzhdyonnom sostoyanii v ryadu orto-oksi-proizvodnykh 2,5-diarilokszola // Khimiya vysokikh energiy. – 1997. – T.31, №6. – S. 428–435./
- Дорошенко А.О., Посохов Е.А. Реакция фотопереноса протона в ряду орто-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола в полистирольных пленках // Теор. и exper. химия. – 1999. – Т.35, №6. – С. 357–361. /Doroshenko A.O., Posokhov Ye.A. Reaktsiya fotoperenosa protona v ryadu orto-gidroksi proizvodnykh 2,5-diaril-1,3-okszola i 2,5-diaril-1,3,4-okszadiazola v polistirolnykh plenkakh // Teor. i eksper. khimiya. – 1999. – T.35, №6. – S. 357–361./
- Жуков В.И., Ткаченко А.С. Система перекисного окисления липидов и активность апоптоза при экспериментальном хроническом гастроэнтероколите // Научные ведомости Белгородского университета. Медицина. Фармация. – 2013. – №18 (161), вып.23. – С. 138–141. /Zhukov V.I., Tkachenko A.S. Sistema perekisnogo okisleniya lipidov i aktivnost' apoptoza pri eksperimental'nom khronicheskom gastroenterokolite // Nauchnyye vedomosti Belgorodskogo universiteta. Meditsina. Farmatsiya. – 2013. – №18 (161), vyp.23. – S. 138–141./
- Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран. Пат. 68871 Україна, МПК G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). / Є.О.Посохов, заявник і власник патенту Харківський нац. ун-т імені В.Н.Каразіна. №U201112552; заявл. 26.10.2011; опубл. 10.04.2012, Бюл. №7. /Nabir fluorescentnykh zondiv dlya vyznachennya fiziko-khimichnykh vlastyivostey lipidnykh membrane. Pat. 68871 Ukraina, MPK G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). / Ye.O.Posokhov, zayavnyk i vlasnyk patentu Kharkivskyy nats. un-t imeni V.N.Karazina. №U201112552; zayavl. 26.10.2011; opubl. 10.04.2012, Byul. №7./
- Посохов Е.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований мембран клеток обонятельного анализатора крыс // Вісник Харківського національного університету. – 2011. – №976, серія «Хімія», вип.20 (43). – С. 92–99. /Posokhov Ye.A. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-okszola i 2,5-difenil-1,3,4-okszadiazola v kachestve fluorescentnykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy membran kletok obonyatel'nogo analizatora krys // Visnyk Kharkivsk'ogo natsional'nogo universytetu. – 2011. – №976, seriya «Khimiya», vyp.20 (43). – S. 92–99./
- Посохов Е.А., Бойко Т.П., Бевзюк Д.А. Орто-гидрокси производные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран // Вестник Харьковского национального университета. – 2001. – №532, серия «Химия», вып.7 (30). – С. 192–194. /Posokhov Ye.A., Boyko T.P., Bevzyuk D.A. Orto-gidroksi proizvodnyye 2,5-difenil-1,3-okszola i 2,5-difenil-1,3,4-okszadiazola v kachestve fluorescentnykh zondov dlya toksikologicheskikh issledovaniy model'nykh biomembran // Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta. – 2001. – №532, seriya «Khimiya», vyp.7 (30). – S. 192–194./
- Спосіб моделювання хронічного гастроентероколіту. Пат. 97322 Україна, МПК G09V 23/28 (2006.01). / Т.О.Іваненко, В.О.Коробчинський, Г.І.Губіна-Вакулик та ін.; заявник і патентовласник Харківський нац. мед. ун-т. №a201014510; заявл. 06.12.2010; опубл. 25.10.2012, Бюл. №2/2012. /Sposib modelyuvannya khronichnogo gastroenterokolitu. Pat. 97322 Ukrayina, MPK G09V 23/28 (2006.01). / T.O.Ivanenko, V.O.Korobchynskyy, G.I.Gubina-

Vakulyk ta in.; zayavnyk i patentovlasnyk Kharkivs'kyi nats. med. un-t. №a201014510; zayavl. 06.12.2010; opubl. 25.10.2012, Byul. №2/2012./

Ткаченко А.С., Жуков В.И., Литвиненко Е.Ю. Окислительный стресс и активность апоптоза при хроническом каррагинан-индуцированном гастроэнтероколите // *Загальна патологія та патологічна фізіологія*. – 2013. – Т.8, №1. – С. 74–79. /Tkachenko A.S., Zhukov V.I., Litvinenko Ye.Yu. Okislitel'nyy stress i aktivnost' apoptoza pri khronicheskom karragenan-indutsirovannom gastroenterokolite // *Zagal'na patologiya ta patologichna fiziologiya*. – 2013. – Т.8, №1. – С. 74–79./

Borthakur A., Bhattacharyya S., Dudeja P.K. et al. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – Vol.292 (3). – P. 829–838.

Disalvo E.A., Larion F., Martini F. et al. Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces // *Biochim Biophys. Acta.* – 2008. – Vol.1778. – P. 2655–2670.

Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A., Ptyagina L.M. Excited state intramolecular proton transfer reaction and luminescent properties of the ortho-hydroxy derivatives of 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole // *J. Physical Organic Chemistry*. – 2000. – Vol.13. – P. 253–265.

Doroshenko A.O., Posokhov E.A., Verezubova A.A. et al. Radiationless deactivation of excited phototautomer form and molecular structure of ESIPY-compounds // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – No 1. – P. 92–99.

Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M. et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells // *Nature*. – 2000. – Vol.405. – P. 85–90.

Gubina-Vakyulyk G.I., Gorbach T.V., Tkachenko A.S., Orlova M.A. Damage and regeneration of small intestinal enterocytes under the influence of carrageenan induces chronic enteritis // *Comp. Clin. Pathology*. – 2015. – Vol.24, issue 6. – P. 1473–1477.

Ho C., Stubbs C.D. Hydration at the membrane protein-lipid interface // *Biophysical Journal*. – 1992. – Vol.63. – P. 897–902.

Ho C., Slater S.J., Stubbs C.D. Hydration and order in lipid bilayers // *Biochemistry*. – 1995. – Vol.34. – P. 6188–6195.

Martin S.E., Reutelingsperger C.P., McGahon A.J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol.182. – P. 1545–1556.

Matsura T., Togawa A., Kai M. et al. The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas-mediated apoptotic cell surface // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – Vol.1736. – P. 181–188.

Morris C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse // *Inflammation Protocols*. – 2003. – №225. – P. 115–121.

Pricolo V.E., Madhere S.M., Finkelstein S.D. Effects of lambda-carrageenan induced experimental enterocolitis on splenocyte function and nitric oxide production // *J. Surg. Res.* – 1996. – Vol.66, №1. – P. 6–11.

Schlegel R.A., Stevens M., Lumley-Sapanski K. et al. Altered lipid packing identifies apoptotic thymocytes // *Immunol. Lett.* – 1993. – Vol.36. – P. 283–288.

Shapiro H.M. Flow cytometry. – New York: Science, 1995. – 542p.

Tobacman J.K., Wallace R.B., Zimmerman M.B. Consumption of carrageenan and other water-soluble polymers used as food additives and incidence of mammary carcinoma // *Med. Hypotheses*. – 2001. – Vol.56 (5). – P. 589–598.

Van den Eijnde S.M., Boshart L., Reutelingsperger C.P.M. et al. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry in vivo: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis // *Cell Death Differ.* – 1997. – Vol.4. – P. 311–316.

Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells // *Blood*. – 1997. – Vol.89. – P. 1121–1132.

Представлено: Н.Н.Іванова / Presented by: N.N.Ivanova

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 31.03.2016

УДК: 612.1:796

Особенности вегетативной регуляции сердца в спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів

Т.Я.Шевчук, А.П.Романюк

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки (Луцьк, Україна)
tetyana_shevchuk_2013@ukr.net, romaniuk.alona@mail.ru

У статті розглянуто особливості вегетативної регуляції серцевого ритму в спортсменів. В ході дослідження було обстежено спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів, з використанням методики варіабельності серцевого ритму (ВСР). Було вивчено основні часові, спектральні та показники ВСР (за Р.М.Баєвським), а також встановлено переважаючий тип вегетативної регуляції серцевої діяльності. Спортсмени ігрових видів спорту характеризувалися зниженням часових показників, окрім частоти серцевих скорочень. Аналіз спектральних показників виявив збільшення значень у спортсменів-легкоатлетів. Встановлено переважаючий симпатичний тип вегетативної регуляції серця у спортсменів ігрових видів спорту, а у легкоатлетів виявлено переважаючий парасимпатичний тип вегетативної регуляції. Отримані результати свідчать про зниження механізмів саморегуляції та активації центрів енерго-метаболического обміну у спортсменів ігрових видів спорту. У спортсменів-легкоатлетів встановлено вищий рівень фізичної тренуваності та відзначено зменшення активності центрального контуру управління.

Ключові слова: *варіабельність серцевого ритму, симпатичний тип вегетативної регуляції, парасимпатичний тип вегетативної регуляції, спортсмени ігрових видів спорту, спортсмени-легкоатлети.*

Особенности вегетативной регуляции сердца у спортсменов игровых видов спорта и легкоатлетов

Т.Я.Шевчук, А.П.Романюк

В статье рассмотрены особенности вегетативной регуляции сердечного ритма у спортсменов. В ходе исследования были обследованы спортсмены игровых видов спорта и легкоатлеты, с использованием методики вариабельности сердечного ритма (ВСР). Были изучены основные временные, спектральные и показатели ВСР (по Р.М.Баевскому), а также установлен преобладающий тип регуляции сердечной деятельности. Спортсмены игровых видов спорта характеризовались снижением временных показателей, кроме частоты сердечных сокращений. Анализ спектральных показателей выявил увеличение значений у спортсменов-легкоатлетов. Установлен преобладающий симпатический тип вегетативной регуляции сердца у спортсменов игровых видов спорта, а у легкоатлетов выявлен преобладающий парасимпатический тип вегетативной регуляции. Полученные результаты свидетельствуют о снижении механизмов саморегуляции и активации центров энерго-метаболического обмена у спортсменов игровых видов спорта. У спортсменов-легкоатлетов показан более высокий уровень физической тренированности и отмечено уменьшение активности центрального контура регуляции.

Ключевые слова: *вариабельность сердечного ритма, симпатический тип вегетативной регуляции, парасимпатический тип вегетативной регуляции, спортсмены игровых видов спорта, спортсмены-легкоатлеты.*

The features of vegetative regulation of heart in athletes and team sports athletes

T.Ya.Shevchuk, A.P.Romaniuk

The article describes the features of the vegetative regulation of the heart rate in athletes. There have been examined athletes and team sports athletes, using heart rate variability (HRV) techniques. Main temporary, spectral and HRV (by R.M.Baevsky) indices were studied as well as predominant type of cardiac activity regulation. Team sports athletes were characterized by a decrease in temporary indices, except for the heart rate. Analysis of spectral indexes showed an increase of the indices in athletes. Sympathetic type of vegetative regulation was dominant in team sports athletes, and parasympathetic type was revealed in athletes. The results show a decrease in the mechanisms of self-regulation and activation of energy-metabolic exchange centers in team sports athletes. Athletes demonstrated a high level of physical fitness and a marked decrease in the activity of the central regulation contour.

Key words: *heart rate variability, sympathetic type of vegetative regulation, parasympathetic type of vegetative regulation, team sports athletes, athletes.*

Вступ

Спортивна діяльність представляє собою специфічний вид діяльності, що спрямована на виявлення резервних та адаптивних можливостей людини. Систематичні фізичні навантаження викликають перебудову у функціонуванні серцево-судинної системи, що сприймається як частина нормальної фізіологічної адаптації до фізичного навантаження. Дослідженню ритму серця в процесі адаптації до фізичних навантажень нині приділяється велика увага (Михалюк и др., 2014). Оскільки все в живому організмі піддається регуляції, то неможливо оцінити функціональний стан організму і його адаптаційні можливості без визначення якості регуляції.

Залежно від характеру механізмів регуляції, рівня фізіологічних резервів і фізіологічної ціни адаптації основних адаптивних систем визначається стійкість організму спортсмена до тренувальних і змагальних навантажень, спортивного результату, збереження позитивної динаміки стану здоров'я.

Аналіз особливостей вегетативної регуляції серця в останні десятиліття широко використовується в кардіологічних дослідженнях галузей медицини, спортивної фізіології та інших. В основі визначення показників варіабельності серцевого ритму лежить оцінка послідовних інтервалів R–R синусового походження, що забезпечує отримання кількісної інформації про модулюючий вплив на серце парасимпатичного і симпатичного відділу вегетативної нервової системи (Неханевич, 2014; Снежицкий, 2003). Ритм серця підпорядковується ієрархічній системі структур та механізмів, включаючи мозковий і внутрішньосерцевий рівні.

Нині не достатньо вивченим залишається проблема довготривалої адаптації до фізичних навантажень різної спрямованості спортсменів, у тому числі активність рівня нейровегетативної регуляції серцево-судинної системи (Кайкан, 2012). Враховуючи той факт, що оцінка показників варіабельності серцевого ритму є одним із основних показників вивчення адаптаційних можливостей, а також індивідуальною характеристикою спортсменів різної спортивної спеціалізації, актуальним є питання вивчення особливостей вегетативної регуляції серця у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів.

Науковий доробок щодо вивчення варіабельності серцевого ритму у спортсменів є доволі значним (Кайкан, 2012; Снежицкий, 2003; Pichot et al., 2000; Pereira et al., 2015). Низка авторів займалися дослідженням вегетативної регуляції серця у дітей, які отримували постійні фізичні навантаження. У роботі (Шлык, 2009) було встановлено зниження впливу центру, посилення активності автономної регуляції на ритм серця під час тривалих фізичних навантажень.

А.А.Псеунок, М.А.Муготлев вивчали вплив спортивних фізичних навантажень на регуляторно-адаптивні можливості юних дзюдоїстів, як представників ациклічних видів спорту. Було доведено позитивний вплив фізичних навантажень на кардіо-респіраторну систему і організм в цілому (Псеунок, Муготлев, 2011).

Автори (Гречишкіна, Чельшкова, 2011) займалися вивченням взаємозв'язку показників варіабельності ритму серця і зовнішнього дихання у спортсменів з різною направленістю тренувального процесу і встановили, що у спортсменів-легкоатлетів механізми економізації кардіореспіраторної системи є ефективнішими, порівняно з спортсменами швидкісно-силових видів спорту (дзюдо).

А.С.Бань, Г.М.Загородний, О.В.Петрова досліджували варіабельність серцевого ритму у спортсменів ігрових видів спорту, використовуючи вегетативний показник. Було вивчено, що зниження чи збільшення значення вегетативного показника буде свідчити про зниження чи збільшення варіабельності серцевого ритму, збільшений ризик розвитку стану перетренованості, захворювань серцево-судинної системи (Бань и др., 2012).

Також зарубіжні наукові дослідження (Pichot et al., 2000) стверджують про позитивний вплив на вегетативну регуляцію серця під час фізичних навантажень циклічного характеру (легка атлетика) та переважання парасимпатичного відділу вегетативної нервової системи.

Проте слід зауважити, що є недостатньо висвітлена проблема особливостей вегетативної регуляції серця у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів, з урахуванням часових, спектральних та показників ВСР (за Р.М. Баєвським), що і зумовило актуальність нашого дослідження.

Мета дослідження – вивчити особливості вегетативної регуляції серця у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів. Відповідно до мети вирішувались такі завдання:

- дослідити часові та спектральні показники варіабельності серцевого ритму у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів;
- вивчити показники ВСР (за Р.М.Баєвським) у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів;

- проаналізувати та встановити переважаючий тип регуляції серцевої діяльності у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів.

Об'єкти та методи дослідження

Дослідження проводилося в лабораторії вікової нейрофізіології кафедри фізіології людини і тварин СНУ імені Лесі Українки. Запис варіабельності серцевого ритму здійснювали за допомогою портативного електрокардіографа «КардіоЛаб ВСР», розробленого «ХАІ-МЕДИКА». Стан вегетативної нервової системи на базі аналізу варіабельності серцевого ритму досліджували в умовах відносного спокою – визначення вегетативного фону або загального вегетативного тону. Тривалість ЕКГ-запису складала 300 секунд. Запис моніторної ЕКГ з метою аналізу варіабельності серцевого ритму здійснювали вранці після 1,5–2 години після прийому їжі, в тихій затемненій кімнаті, з постійною температурою – 20–22°C. Запис здійснювали в положенні лежачи на спині, при спокійному диханні: обстежуваний не кашляв, не ковтав слини, не розмовляв, не робив глибоких вдихів.

У дослідженні взяли участь 140 осіб чоловічої статі. Всі вони були спортсменами різної спеціалізації та кваліфікації, віком 17–25 років. Спортсмени були здоровими, за даними соматичного та психоневрологічного обстеження. Згідно спортивної спеціалізації поділені на дві групи: I група – спортсмени ігрових видів спорту (баскетбол, волейбол, футбол), II група – спортсмени-легкоатлети (спринт, стаєри, спортивна ходьба). Спортсмени мали спортивне звання майстра спорту, а також спортивні розряди від III до кандидата у майстри спорту.

Число досліджуваних складало 70 осіб у кожній групі. Розрахунок об'єму вибірки здійснювався за допомогою модуля «Планування експерименту» в статистичному пакеті MedStat (Лях і др., 2006).

Статистичний аналіз даних здійснювали, використовуючи статистичний пакет MedStat. В залежності від розподілу даних, що піддаються нормального чи відмінному від нормального розподілу значень, використовували описову статистику, T–критерій Стьюдента, W–критерій Вілкоксона.

Результати та обговорення

Важливим завданням сучасної функціональної діагностики є оцінка рівня взаємозв'язку центральних і автономних механізмів регуляції. Схема двоконтурної регуляції була вперше описана в 60-ті роки. Кожному елементу регуляторного механізму відповідає визначений показник варіабельності серцевого ритму. Автономний контур регуляції представлений парасимпатичним відділом вегетативної нервової системи, центральний контур – різними рівнями регуляції: від симпатичного судинного центру довгастого мозку до вищих вегетативних центрів гіпоталамо-гіпофізарного рівня (Баевский, 2004).

В ході наукового дослідження були отримані результати варіабельності серцевого ритму у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів і виявлені статистичні відмінності між значеннями часових, спектральних та показників Р.М.Баєвського.

Серед всіх показників ми брали до уваги – HR, SDNN, CV, TP, HF, LF, VAP, Mo, Aмо, SI. HR – один із основних показників ВСР, який характеризує рівень функціонування серцево-судинної системи (Псеунок, Муготлев, 2011). Фізичний зміст показника – частота серцевих скорочень. Виявлено статистично відмінні значення HR між групами досліджуваних. У групі спортсменів ігрових видів спорту HR становить $74,31 \pm 3,618$ та у легкоатлетів $61,13 \pm 4,745$, при $p < 0,001$. Значення HR є нижчим у спортсменів-легкоатлетів, порівняно з спортсменами ігрових видів спорту, тобто переважають парасимпатичні впливи механізмів регуляції у легкоатлетів. Незважаючи на те, що ведучими фізіологічними системами забезпечення роботи в циклічних видах спорту є киснево-транспортні системи, значну роль відіграє центральна нервова система. Вона забезпечує регуляцію рухів, які здійснюються з великою швидкістю, що потребує високого рівня збудливості і лабільності нервових центрів та високого рівня рухливості нервових центрів. Можна припустити, що всі ці потреби сприяють тому, що вегетативний статус легкоатлетів можна представити як зниження вагусного впливу на ритм серця і помірне напруження регуляторних систем.

Показник варіабельності серцевого ритму – SDNN (стандартне відхилення, мс) характеризує сумарний ефект вегетативної регуляції кровообігу (Баевский и др., 2001; Вовканич та ін., 2010). Зменшення величини SDNN засвідчує посилення активності симпатичного відділу вегетативної нервової системи. У спортсменів ігрових видів спорту SDNN становило $63,29 \pm 17,51$, а у легкоатлетів $86,57 \pm 24,78$ (рис. 1). Значення статистично відмінні при $p < 0,001$. Зменшення SDNN у спортсменів ігрових видів спорту свідчить про посилення симпатичної регуляції та зниження активності

автономного контуру. Спортсмени-легкоатлети характеризуються збільшеними значеннями, і такий результат може бути пов'язаний як із симпатичними, так із парасимпатичними впливами на ритм серця. Також можна припустити посилення автономної регуляції та збільшення впливу дихання на ритм серця у легкоатлетів.

Коефіцієнт варіації повного масиву кардіоінтервалів CV, як нормований показник сумарного ефекту регуляції (Кайкан, 2012), статистично відрізнявся у двох групах досліджуваних. У першій групі спортсменів він становив $7 \pm 0,31$, а в другій групі $8 \pm 0,37$, при $p < 0,008$.

TP (загальна потужність спектру) – відображає сумарну активність вегетативного впливу на серцевий ритм, зростає із збільшенням впливів парасимпатичної нервової системи (Баевский, 2004; Вовканич та ін., 2010). Виявлено статистично відмінні значення показників при $p < 0,001$. TP у спортсменів ігрових видів спорту становила $3513 \pm 370,8$, а у легкоатлетів $7901 \pm 568,3$. Такий результат вказує на мобілізацію функціональних резервів організму в спортсменів ігрових видів спорту та активацію серцево-судинного центру головного мозку.

HF – потужність спектра високочастотного компонента варіабельності, характеризує відносний рівень активності парасимпатичної ланки регуляції (Pichot et al., 2000). Значення HF у першій групі $656 \pm 111,6$, у другій групі $2430 \pm 201,3$, при $p < 0,001$. Зростання щільності високочастотного спектру потужності ритму серця вказує на активацію парасимпатичного тону вегетативної нервової системи у спортсменів-легкоатлетів (Da Silva et al., 2015).

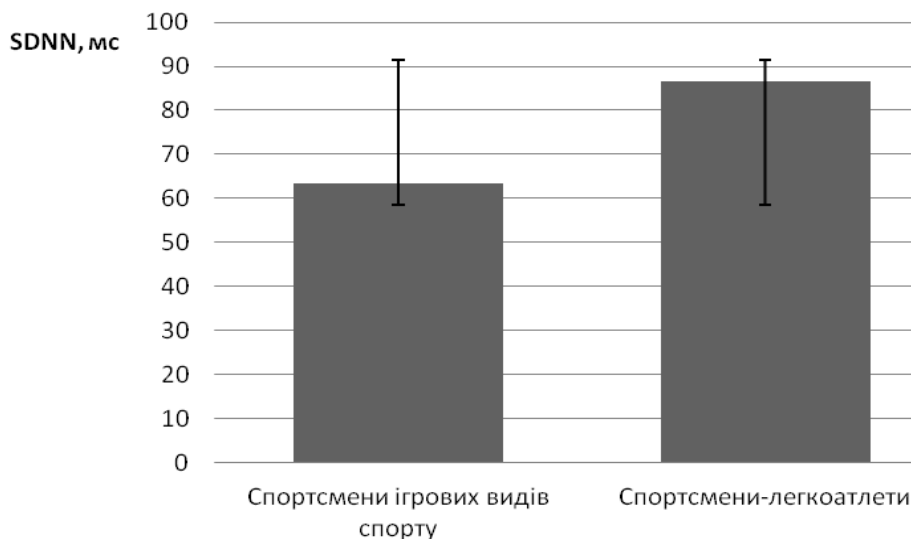


Рис. 1. Значення SDNN у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів

LF – потужність спектра низькочастотного компонента варіабельності, характеризує рівень активності вазомоторного центру (Вовканич та ін., 2010; Снежицкий, 2003). Між значеннями LF виявлено статистичну різницю, $p < 0,001$. У спортсменів ігрових видів спорту LF становить $1452,5 \pm 138,4$ та в легкоатлетів $2390 \pm 396,1$. На потужність в цьому діапазоні впливають зміни як симпатичної (переважно), так і парасимпатичної активності. Нижчі значення цього показника у групі спортсменів ігрових видів спорту вказують на зниження активності симпатичного відділу серцево-судинного центру довгастого мозку (Уткина, 2015; Garcia-Tabar et al., 2015).

Варіаційний розмах (BAP) відображає ступінь варіативності значень кардіоінтервалів в досліджуваному динамічному ряду (Вовканич та ін., 2010) та характеризує тонус блукаючого нерва. За фізіологічним змістом BAP – це максимальна амплітуда регуляторних впливів вегетативної нервової системи. Цей показник є статистично нижчим у спортсменів ігрових видів спорту – $278,7 \pm 56,41$, значення BAP у легкоатлетів становить $314,3 \pm 63,74$, $p < 0,001$, – тобто переважає активність парасимпатичної ланки вегетативної регуляції серця.

Mo – це значення RR-інтервалів, яке найбільш часто зустрічається і відповідає найбільш ймовірному рівню функціонування систем регуляції (Шлык, 2009). Значення Mo у спортсменів ігрових

видів спорту є статистично нижчим, ніж у спортсменів-легкоатлетів, і становить $750 \pm 7,36$ та $950 \pm 13,4$ відповідно, $p < 0,001$. Відповідно значення Амо, тобто число кардіоінтервалів, яке відповідає значенню моди, у % до об'єму вибірки є вищим у спортсменів ігрових видів спорту. Це відображає стабілізуючий ефект централізації управління ритмом серця, який обумовлений в основному ступенем активації симпатичного відділу вегетативної нервової системи. Амо у спортсменів ігрових видів спорту становить $32,57 \pm 8,74$ та у легкоатлетів $23,5 \pm 1,31$, $p < 0,001$.

SI – індекс напруження Р.М.Баєвського, що характеризує активність механізмів симпатичної регуляції, стан центрального контуру регуляції. Цей показник є дуже чутливим до підвищення тону симпатичної нервової системи. Він широко застосовується в спортивній медицині, фізіології праці, космічних дослідженнях, а також в клінічній практиці та інших галузях (Вовканич та ін., 2010; Снежицкий, 2003; Pichot et al., 2000). У спортсменів норма показника SI складає 50–150 одиниць. Значення показника є вищим у спортсменів ігрових видів спорту – $82,01 \pm 37,92$, порівняно з спортсменами-легкоатлетами – $38 \pm 5,7$ (рис. 2). Низькі значення індексу напруження Р.М.Баєвського вказують на вищу фізичну тренуваність. Зважаючи на це, вищий рівень фізичної тренуваності є у спортсменів-легкоатлетів.

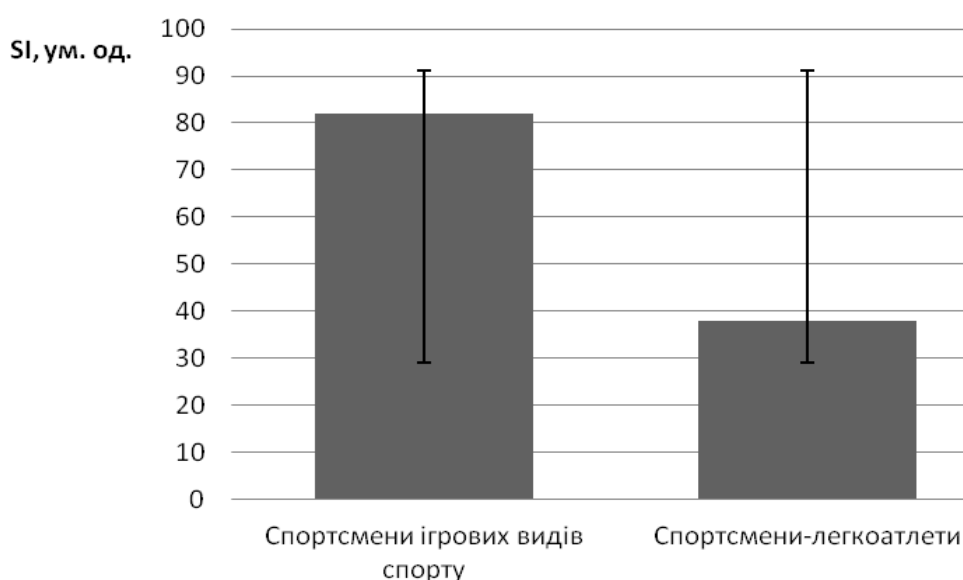


Рис. 2. Значення SI у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів

Переважаючий тип регуляції серцевої діяльності аналізували за ритмограмою. У спортсменів ігрових видів спорту ритмограма варіабельності серцевого ритму характеризувалася мало вираженими хвилями з відносною їх постійністю. Даний характер ритмограми і регуляції ритму серця відображає посилення симпатичних впливів. У спортсменів-легкоатлетів, навпаки, спостерігалися добре виражені повільні і дуже повільні хвилі, а також нерегулярні швидкі хвилі. Такий характер ритмограми засвідчує переважання парасимпатичних впливів і дуже високі функціональні можливості серця (Черкес та ін., 2014).

Таким чином, вивчення особливостей варіабельності серцевого ритму дає змогу оцінити стан механізмів регуляції фізіологічних функцій в організмі людини, а також загальної активності регуляторних механізмів, нейрогуморальної регуляції серця, співвідношення між симпатичною та парасимпатичною ланками вегетативної нервової системи. Досить важливим є і те, що отримані дані про функціональний стан спортсмена в подальшому можуть використовуватись для оцінки тренувального процесу спортсмена та шляхів його оптимізації.

Висновки

Дослідження показників вегетативної регуляції серця показало статистичну відмінність між показниками варіабельності серцевого ритму у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів. У

спортсменів ігрових видів спорту виявлено домінуючу роль симпатичної ланки вегетативної регуляції серця. Зафіксовано зниження механізмів саморегуляції та активації центрів енерго-метаболічного обміну. У цій групі переважаючим є симпатичний тип серцевої діяльності. У спортсменів-легкоатлетів виявлено переважання парасимпатичної ланки регуляції над симпатичною. Встановлено вищий рівень фізичної тренуваності та відзначено зменшення активності центральної контури регуляції. Цій групі спортсменів притаманний переважаючий парасимпатичний тип регуляції серця.

Перспективи подальших досліджень

Подальше вивчення особливостей показників варіабельності серцевого ритму у динаміці в спортсменів різних видів спорту з різним рівнем ситуативної та особистісної тривожності, а також вивчення нейровегетативного забезпечення у спортсменів ігрових видів спорту та легкоатлетів.

Список літератури

- Баевский Р.М. Анализ вариабельности сердечного ритма: история, философия, теория и практика // Клиническая информатика и телемедицина, 2004. – Т.1, №1. – С. 54–65. /Bayevskiy R.M. Analiz variabel'nosti serdechnogo ritma: istoriya, filosofiya, teoriya i praktika // Klinicheskaya informatika i telemeditsina, 2004. – Т.1, №1. – С. 54–65./
- Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В. и др. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем // Вестник аритмологии. – 2001. – №24. – С. 65–87. /Bayevskiy R.M., Ivanov G.G., Chireykin L.V. i dr. Analiz variabel'nosti serdechnogo ritma pri ispol'zovanii razlichnykh elektrokardiograficheskikh sistem // Vestnik aritmologii. – 2001. – №24. – С. 65–87./
- Бань А.С., Загородный Г.М., Петрова О.В. Использование вегетативного показателя для оценки вариабельности ритма сердца спортсменов игровых видов спорта // Современные проблемы реабилитации и спортивной медицины. Материалы Республиканской научн.-практ. конф. – Гродно, 2012. – С. 29–33. /Ban' A.S., Zagorodnyy G.M., Petrova O.V. Ispol'zovaniye vegetativnogo pokazatelya dlya otsenki variabel'nosti ritma serdtsa sportsmenov igrovyykh vidov sporta // Sovremennyye problemy reabilitatsii i sportivnoy meditsiny. Materialy Respublikanskooy nauchn.-prakt. konf. – Grodno, 2012. – С. 29–33./
- Вовканич Л., Виноградський Б., Власов А. та ін. Використання показників варіабельності серцевого ритму для характеристики функціональної підготовленості спортсменів-біатлоністів // Молода спортивна наука України. – 2010. – Т.3. – С. 50–55. /Vovkanych L., Vynogradskyy B., Vlasov A. ta in. Vykorystannya pokaznykiv variabel'nosti sertseвого rytmu dlya kharakterystyky funktsional'noyi pidgotovlenosti sportsmeniv-biatlonistiv // Moloda sportyvna nauka Ukrayiny. – 2010. – Т.3. – С. 50–55./
- Гречишкина С.С., Челышкова Т.В. Анализ взаимосвязи спектральных и временных показателей вариабельности ритма сердца у спортсменов // Вариабельность сердечного ритма: теоретические аспекты и практические применение. Мат. V Всеросс. симпозиума. – Ижевск, 2011. – С. 238–244. /Grechishkina S.S., Chelyshkova T.V. Analiz vzaimosvyazi spektral'nykh i vremennykh pokazatelyey variabel'nosti ritma serdtsa u sportsmenov // Variabel'nost' serdechnogo ritma: Teoreticheskiye aspekty i prakticheskkiye primeneniye. Materialy V Vseross. simpoziuma. – Izhevsk, 2011. – С. 238–244./
- Кайкан С.М. Особенности функционального состояния сердечно-сосудистой системы и нейровегетативной регуляции ее деятельности у конькобежков-спринтеров. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / 03.03.01 – физиология. – Челябинск, 2012. – 25с. /Kaykan S.M. Osobennosti funktsional'nogo sostoyaniya serdechno-sosudistoy sistemy i neyrovegetativnoy regulyatsii yeye deyatel'nosti u kon'kobezhek-sprinterov. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk / 03.03.01 – fiziologiya. – Chelyabinsk, 2012. – 25s./
- Лях Ю.Е., Гурьянов В.Г., Хоменко В.Е., Панченко О.А. Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MadStat. – Донецк, 2006. – 211с. /Lyakh Yu.Ye., Gur'yanov V.G., Khomenko V.Ye., Panchenko O.A. Osnovy komp'yuternoy biostatistiki: analiz informatsii v biologii, meditsine i farmatsii statisticheskim paketom MadStat. – Donetsk, 2006. – 211s./
- Михалюк Е.Л., Малахова С.Н., Диденко М.В. Вегетативное обеспечение центральной гемодинамики и физической работоспособности бегуний на средние дистанции // Патология. – 2014. – №1 (30). – С. 96–99. /Mikhalyuk Ye.L., Malakhova S.N., Didenko M.V. Vegetativnoye obespecheniye tsentral'noy gemodinamiki i fizicheskoy rabotosposobnosti beguniy na sredniye distantsii // Patologiya. – 2014. – № 1 (30). – С. 96–99./
- Неханевич О.Б. Ознаки дезадаптації серцево-судинної системи до фізичних навантажень за даними варіабельності серцевого ритму // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип.1 (106). – С. 317–320. /Nekhanevych O.B. Oznaky dezadaptatsiyi sertsevo-sudynnoyi sistemy do fizychnykh navantazhen' za danymy variabel'nosti sertseвого rytmu // Visnyk problem biologiyi i medytsyny. – 2014. – Vyp.1 (106). – С. 317–320./
- Псеунок А.А., Муготлев А.М. Влияние спортивных физических нагрузок на регуляторно-адаптивные возможности юных дзюдоистов 10–12 лет // Вариабельность сердечного ритма: Теоретические аспекты и практическое применение. Мат. V Всеросс. симпозиума. – Ижевск, 2011. – С. 322–330. /Pseunok A.A., Mugotlev A.M. Vliyaniye sportivnykh fizicheskikh nagruzok na regulyatorno-adaptivnyye vozmozhnosti yunyykh

dzyudoistov 10–12 let // Variabel'nost' serdechnogo ritma: Teoreticheskiye aspekty i prakticheskoye primeneniye. Mat. V Vseross. simpoziuma. – Izhevsk, 2011. – S. 322–330./

Снежицкий В.А. Показатели вариабельности сердечного ритма у больных с ваготонической дисфункцией синусового узла при проведении ортостатической пробы // Вестник аритмологии. – 2003. – №33. – С. 28–33. /Snezhitskiy V.A. Pokazateli variabel'nosti serdechnogo ritma u bol'nykh s vagotonicheskoy disfunktsiyey sinusovogo uzla pri provedenii ortostaticheskoy proby // Vestnik aritmologii. – 2003. – №33. – S. 28–33./

Уткина А.Г. Особенности методики физического оперативного контроля состояния спортсмена при помощи «Информационно-диагностического комплекса восстановления функционального состояния организма спортсмена» // Слобожанський науково-спортивний вісник. – 2015. – №2 (46). – С. 210–213. /Utkina A.G. Osobennosti metodiki fizicheskogo operativnogo kontrolya sostoyaniya sportsmena pri pomoshchi «Informatsionno-diagnosticheskogo kompleksa vosstanovleniya funktsional'nogo sostoyaniya organizma sportsmena» // Slobozhans'kiy naukovosporyvnyy visnyk. – 2015. – №2 (46). – S. 210–213./

Черкес Л., Ільїн В., Колот А. та ін. Особливості адаптації до умов середньогір'я спортсменів високої кваліфікації, які спеціалізуються у бігу на середні дистанції, залежно від типу вегетативного гомеостазу // Теорія і методика фізичного виховання і спорту. – 2014. – №3. – С. 82–86. /Cherkes L., Il'yin V., Kolot A. ta in. Osoblyvosti adaptatsiyi do umov serechn'ogir'ya sportsmeniv vysokoyi kvalifikatsiyi, yakі spetsializuyut'sya u bigu na serechni dystantsiyi, zalezchno vid typu vegetatyvnogo gomeostazu // Teoriya i metodyka fizichnogo vykhovannya i sportu. – 2014. – №3. – S. 82–86./

Шлык Н.И. Сердечный ритм и тип регуляции у детей, подростков и спортсменов. – Ижевск, 2009. – 259с. /Shlyk N.I. Serdechnyy ritm i tip regulyatsii u detey, podrostkov i sportsmenov. – Izhevsk, 2009. – 259s./

Da Silva V.P., de Oliveira N.A., Silveira H. et al. Heart rate variability indexes as a marker of chronic adaptation in athletes: a systematic review // Annals of Noninvasive Electrocardiology. – 2015. – Vol.20, issue 2. – P. 108–118.

Garcia-Tabar I., Llodio I., Sánchez-Medina L. et al. Heart rate based prediction of fixed blood lactate thresholds in professional team-sport players // Journal of Strength & Conditioning Research. – 2015. – Vol.29 (10). – P. 2794–2801.

Pereira L.A., Flatt A.A., Ramirez-Campillo R. et al. Assessing shortened field-based heart-rate variability data acquisition in team-sport athletes // Int. J. of Sports Physiology and Performance. – 2016. – Vol.11. – P. 154–158.

Pichot V., Roche F., Gaspoz J.-M. et al. Relation between heart rate variability and training load in middle-distance runners // Medicine & Science in Sports & Exercise. – 2000. – Vol.32 (10). – P. 1729–1736.

Представлено: В.В.Чижик / Presented by: V.V.Chizhik
Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko
Подано до редакції / Received: 08.10.2015

••• КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ ••• BRIEF COMMUNICATIONS •••

UDC: 577.112.7+577.122.2+57.012.6

***In silico* analysis of heme binding effect on the formation of mouse arginyl-tRNA-protein transferase 1 and protein LIAT1 complex**

T.V.Barannik, A.O.Fedorova

V.N.Karazin Kharkiv National University (Kharkiv, Ukraine)
tbarannik@karazin.ua

Ab initio prediction of mouse arginyl-tRNA-protein transferase 1 (R-transferase, EC 2.3.2.8) and protein LIAT1 structures was performed by I-Tasser server. Molecular docking studies of the protein models revealed that potential heme binding sites didn't coincide with the sites of interaction with protein partner in both R-transferase and LIAT1 protein. Heme docking to the complex of two proteins showed LIAT1 protein to provide more preferable sites for heme binding than R-transferase. Heme attachment to the cavities in the core of R-transferase involved in catalysis and the alterations of LIAT1 protein conformation could be the additional mechanisms of heme inhibiting action on protein arginylation.

Key words: *heme binding, arginyl-tRNA-protein transferase, LIAT1 protein, 3D-modelling, docking.*

***In silico* аналіз ефекту зв'язування гему на утворення комплексу аргініл-тРНК-протеїнтрансферази 1 і протеїну LIAT1 миші**

Т.В.Бараннік, А.О.Федорова

Ab initio передбачення структури аргініл-тРНК-протеїнтрансферази 1 (R-трансфераза, КФ 2.3.2.8) і протеїну LIAT1 миші було проведено за допомогою серверу I-Tasser. Молекулярний докінг протеїнових моделей виявив, що потенційні сайти зв'язування гему не співпадають з сайтами взаємодії з протеїнами-партнерами як у R-трансферази, так і у LIAT1 протеїну. Докінг гему до комплексу двох протеїнів показав, що протеїн LIAT1 надає сайти зв'язування, яким гем віддає перевагу у порівнянні з R-трансферазою. Приєднання гему до порожнин в корі R-трансферази, які задіяні у каталізі, та зміни конформації протеїну LIAT1 можуть явитись додатковими механізмами інгібуючої дії гему на аргінілювання білків.

Ключові слова: *зв'язування гему, аргініл-тРНК-протеїнтрансфераза, LIAT1 протеїн, 3D-моделювання, докінг.*

***In silico* анализ эффекта связывания гема на образование комплекса аргинил-тРНК-протеинтрансферазы 1 и белка LIAT1 мыши**

Т.В.Баранник, А.О.Федорова

Ab initio предсказание структуры аргинил-тРНК-протеинтрансферазы 1 (R-трансфераза, КФ 2.3.2.8) и белка LIAT1 мыши было проведено с помощью сервера I-Tasser. Молекулярный докинг белковых моделей выявил, что потенциальные сайты связывания гема не совпадают с сайтами взаимодействия с белками-партнерами как у R-трансферазы, так и у белка LIAT1. Докинг гема к комплексу двух белков показал, что белок LIAT1 предоставляет более предпочтительные сайты связывания гема в сравнении с R-трансферазой. Присоединение гема к полостям в коре R-трансферазы, задействованным в катализе, и изменения конформации белка LIAT1 могут явиться дополнительными механизмами ингибирующего действия гема на аргинилирование белков.

Ключевые слова: *связывание гема, аргинил-тРНК-протеинтрансфераза, белок LIAT1, 3D-моделирование, докинг.*

Introduction

Arginyl-tRNA-protein transferase 1 (ATE1) or R-transferase (EC 2.3.2.8) is one of the executor enzymes of the N-end rule pathway of protein degradation (Varshavsky, 2011). It attaches arginine as one of the primary destabilizing residues to N-terminals of proteins and is regulated by a number of different factors,

including oxidative stress (Hu et al., 2005). ATE1-deficient mice have lethal defects in cardiac and vascular development (An et al., 2006; Lee et al., 2012).

ATE1 sequence contains three Cys-Pro and one Pro-Cys patterns, which are putative heme regulatory motifs (HRM) and are common to various heme-binding proteins (Zhang, Guarente, 1995). Two of four HRM-like motifs from mouse ATE1 – C⁷¹C⁷²P и HSC⁴¹¹P – are conservative for many species. According to experimental data heme induces disulfide bond formation between Cys71-Cys72 in C⁷¹C⁷²P motif and can bind at several sites including C⁴¹¹P thus inhibiting R-transferase activity in mouse under micromolar concentrations (Hu et al., 2008). The character of heme binding and the affinity of other sites of this protein for heme have not been discussed yet.

N-terminal arginylation *in vitro* by R-transferase was shown to be stimulated by protein LIAT1 (Brower et al., 2014). The ability of LIAT1 protein to bind heme hasn't been investigated. Neither full models of these proteins nor homologous solved structures are available for today. Mechanism of their interaction is also unknown. So, we performed *in silico* modelling of R-transferase and LIAT1 protein structures, prediction of heme-binding sites in the unbound proteins and their complex and molecular docking of protein LIAT1 with R-transferase with or without bound heme.

Materials and methods

The amino acid sequences and protein annotations were loaded from UniProt DB: *Mus musculus* arginyl-tRNA-protein transferase 1 (canonical isoform, 516 aa; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Z2A5>) and protein LIAT1 (228 aa; <http://www.uniprot.org/uniprot/Q810M6>). Protein domains were analyzed by the help of InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) and Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) servers.

Ab initio protein structure prediction was performed using I-TASSER server (Yang et al., 2015) without or with template (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

The choice of prediction server was based on its high citation and high rank in CASP7-10 (http://predictioncenter.org/casp10/groups_analysis.cgi). The template choice for R-transferase was guided by its similarity to N-acyltransferases superfamily (IPR016181) revealed by sequence analysis (Rai et al., 2006). So two known structures were chosen as additional templates for prediction: 2Q4V:A (human acetyltransferase SAT2) and 1P4N:A (bacterial peptidoglycan synthase FemX). LIAT1 protein modelling was performed without template. For each variant of prediction I-TASSER server provided five models selected by a confidence score (C-score). Checking of models was carried out on-line by Verify (http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) and Errat servers (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>). Structural alignment of protein structures obtained was performed by TM-align server (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align>).

Docking of proteins was performed by ZDOCK (Pierce et al., 2014), version ZD3.0.2F, without stating of interacting residues (<http://zdock.umassmed.edu/>). Structure file (*.pdb) for heme molecule was loaded from PubChem (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/chemicalCompound/show/HEM>). Docking of proteins with heme as ligand was carried out by on-line tool PatchDock, Beta 1.3 Version (Schneidman-Duhovny et al., 2005; <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>). Docking variants with heme ring not crossed or touched by amino acid side chains were selected for further analysis and the predictions with best scores are presented in results section.

Visualization and analysis of structures (including the selection of residues within certain distance to ligand or other protein chain) were carried out by the help of PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC) and SwissProt viewer 4.1.0 (<http://spdbv.vital-it.ch>).

Results and discussion

The structural models of R-transferase obtained by I-Tasser revealed great differences in the secondary structure from mostly β -organized first model to almost no β -sheets in model 4 (template-free prediction). Model 2 (template-free) containing disulfide bond between Cys71-Cys23; and models 3 and 4 of protein LIAT1 almost fully organized into β -structures and rod-like, were excluded from further analysis. HSC⁴¹¹P sequence was proposed (Hu et al., 2008) to be proximal in the folded enzyme to the disulfide-forming region C⁷¹C⁷²P and the thioredoxin-like motif C²³GYC²⁶. It was assumed that HSC⁴¹¹P and C⁷¹C⁷²P are located adjacent to each other and play role in the ligand binding. Among models obtained for R-transferase no one had all three sites in close proximity to each other. In the model 4 (template-free) C⁷¹C⁷²P is located close to the Cys411 but not to Cys23; in models 3 and 5 (template-free) C⁷¹C⁷²P is located close to Cys23 but not to Cys411. So R-transferase models 3-5 (template-free) and LIAT1 protein models 1, 2 and

5 were selected for docking analysis. In models 3 and 4 of R-transferase C⁷¹C⁷²P motif was placed on the surface, but in model 5 this motif is in the cavity so disulfide C⁷¹C⁷² bond formation could significantly change the conformation of the core protein region (Fig. 1, A).

Amino acids in neighbourhood of heme ring in LIAT1 protein were represented mostly by histidines and motifs of charged amino acids but not by cysteines (Table 1).

Table 1.
Analysis of PatchDock docking results (heme as ligand and selected protein model structures of R-transferase or LIAT1 protein as targets)

Protein model	Contact area	Total Score	Number of AA	Amino acids in neighborhood to heme in the models (predicted to be within 6,5 Å to heme iron)
R-transferase				
model 3	892,6	6346	7 AA	S34; Y35; W55; C79; H80; P81; P441
model 4	816,1	6236	8 AA	E13; K209; K215; E216; S251; S259; V351; Y403
model 5	870,5	6334	7 AA	H171; Y298; Q312; F313; V364; Y365; Y367; F406
LIAT1 protein				
model 1	845,8	6514	14 AA	E19; E20; E22; E23; A48; K55; A100; P102; R103; D104; K105; E107; L130; Q133
model 2	942,7	7166	11 AA	H87; L90; H96; G97; L98; E101; L159; N160; K163; R164; R166
model 5	870,5	6726	12 AA	S85; F86; H87; I89; N108; Q110; S115; D141; G142; I143; L144; T145

Amino acids residues within 6,5 Å from the heme iron in R-transferase models included K215 involved in posttranslational modification (by UniProtKB); aromatic amino acids, Cys79 but not Cys71-72 or Cys411. Such predictions may be linked with mostly geometric approach of the PatchDock tool that doesn't take into account metal coordination and oxidative effects of heme iron. Heme binding at additional sites except HRM-like is in agreement with the experimental analyses of R-transferase mutants (Hu et al., 2008).

Heme docking to selected protein model structures revealed heme placement in the cavities in the central parts of the molecules (Fig. 1, A-C). Heme binding in deep cavity found in the core of the LIAT1 protein model 2 (Fig. 1, D) could greatly affect protein conformation and interaction with R-transferase.

R-transferase works as monomer but the interaction with protein LIAT1 increases its catalytic activity (Brower et al., 2014) so we have modelled the complex of these proteins using ZDOCK tool. An internal conserved 53-residue segment of LIAT1 (113–165) known to be sufficient for binding to R-transferase (Brower et al., 2014) is mostly exposed in model 5 of LIAT1 protein. Higher Z-scores and number of interacting amino acids were shown for complexes of R-transferase model 4 with any selected model of LIAT1 protein (Table 2) comparing to model 5 of R-transferase. In five of six docking variants (Table 2) the amino acid region 113–122 of LIAT1 protein, containing first of three PC motifs (P¹²²C), was predicted to interact with R-transferase.

No coincidence of the predicted sites for heme binding and regions for protein partner interaction was found in both R-transferase and protein LIAT1. This fact may be linked with heme binding in cavities and not at the surface. Therefore, if heme doesn't cause significant conformation changes it seems unlikely that heme binding to either R-transferase or LIAT1 protein impedes their complex formation.

To check more preferable binding sites for heme in the complex of R-transferase and protein LIAT1 we performed molecular docking (by PatchDock) of heme to the complex with different combinations of protein models. Heme docking to the complex of two proteins showed that in more than 80% of results heme was bound to the protein LIAT1 and not to R-transferase. All potential heme-binding sites of LIAT1 protein were not involved into proteins interaction and so could be available for heme.

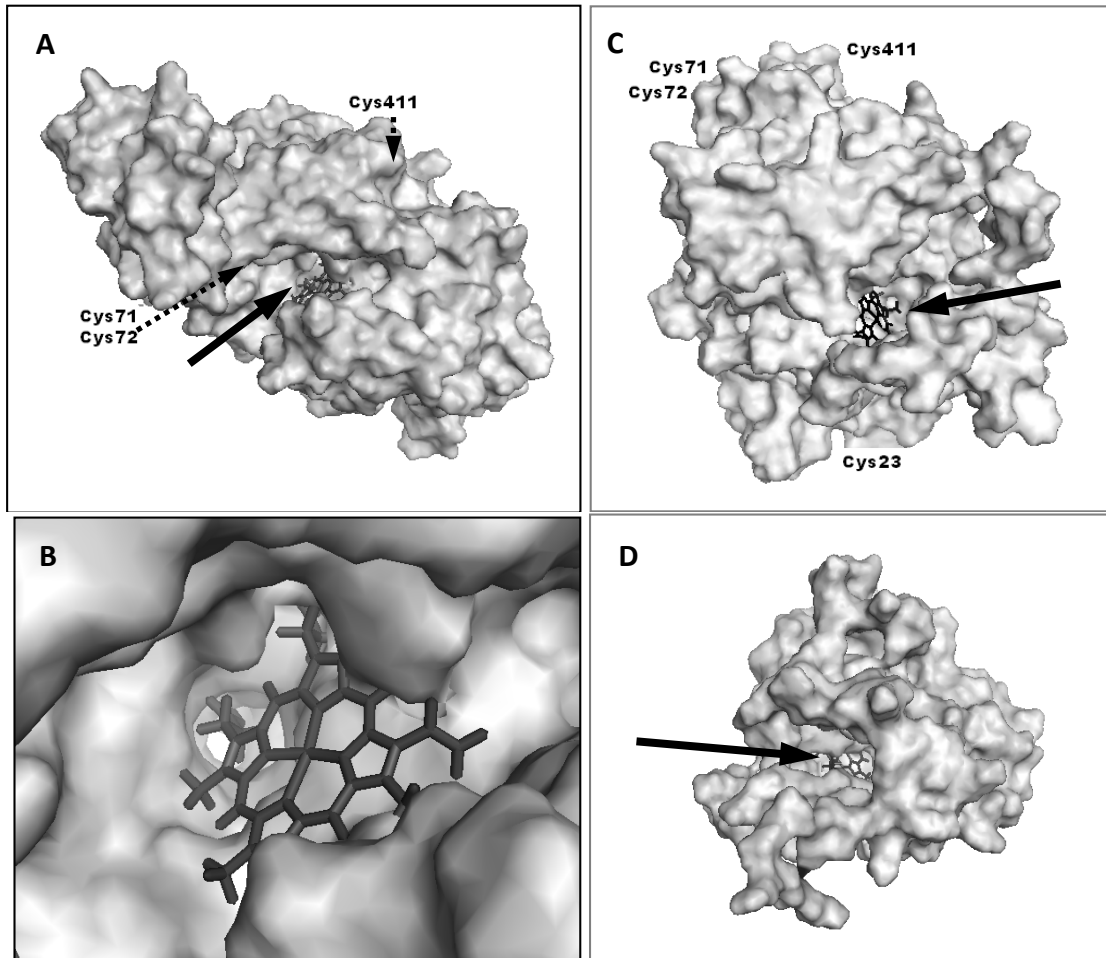


Fig. 1. Visualization of the PatchDock predictions in PyMOL: A – heme docking to model 5 of R-transferase – general view; B – heme placement in the cavity of R-transferase model 5; C – heme docking to model 4 of R-transferase; D – heme docking to model 2 of LIAT1 protein. Solid arrows show heme in the cavities; dotted arrows show location of cysteines in functional motifs

Table 2.
The results of R-transferase and LIAT1 protein model structures docking by ZDOCK: Z-scores and amino acid regions of the contact area (within 6 Å to other chain, analyzed by SwissPDB Viewer)

Model	LIAT1 model 1	LIAT1 model 2	LIAT1 model 5
R-transferase model 4	Z-score=1828.5 R-transferase: 20AA (1–12; 35–38; 258–262) LIAT1: 32 AA (30–40; 113–122; 198–208)	Z-score=1634.5 R-transferase: 36 AA (1–9; 311–323; 333–346) LIAT1: 62 AA (28–40; 87–109; 150–171; 189; 214–228)	Z-score=1889.0 R-transferase: 39 AA (312–350) LIAT1: 49 AA (37–53; 113–130)
R-transferase model 5	Z-score=1103.1 R-transferase: 17 AA (1–12; 326–330) LIAT1: 14 AA (113–124; 206; 210)	Z-score=1325.5 R-transferase: 24 AA (1–14; 59–63; 109–115) LIAT1: 18 AA (56–60; 113–123; 177–178)	Z-score=1267.4 R-transferase: 21 AA (1–10; 24–34) LIAT1: 24 AA (38–42; 113–123; 220–228)

The active site of R-transferase has not been established yet so we can assume that high concentrations of heme could inhibit protein arginylation by three mechanisms. Firstly, heme oxidative action on R-transferase cysteines with further disulfide bond formation between Cys71 and Cys72 (Hu et al., 2008) and change of R-transferase conformation. By the other hand, heme could occupy several cavities of the R-transferase core necessary for catalysis. And additionally, higher affinity of LIAT1 protein to heme comparing to R-transferase could result in the indirect inhibition of the arginyltransferase reaction through the alterations of LIAT1 protein conformation and its consequent dissociation from R-transferase.

References

- An J.Y., Seo J.W., Tasaki T. et al. Impaired neurogenesis and cardiovascular development in mice lacking the E3 ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol.103, no 16. – P. 6212–6217.
- Brower C.S., Rosen C.E., Jones R.H. et al. Liat1, an arginyltransferase-binding protein whose evolution among primates involved changes in the numbers of its 10-residue repeats // *PNAS.* – 2014. – Vol.111, no 46. – P. 4936–4945.
- Hu R.G., Sheng J., Qi X. et al. The N-end rule pathway as a nitric oxide sensor controlling the levels of multiple regulators // *Nature.* – 2005. – Vol.437, no 7061. – P. 981–986.
- Hu R.G., Wang H., Xia Z., Varshavsky A. The N-end rule pathway is a sensor of heme // *PNAS.* – 2008. – Vol.105, no 1. – P. 76–81.
- Lee M.J., Kim D.E., Zakrzewska A. et al. Characterization of arginylation branch of N-end rule pathway in G-protein-mediated proliferation and signaling of cardiomyocytes // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol.287, no 28. – P. 24043–24052.
- Pierce B.G., Wiehe K., Hwang H. et al. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol.30, no 12. – P. 1771–1773.
- Rai R., Mushegian A., Makarova K., Kashina A. Molecular dissection of arginyltransferases guided by similarity to bacterial peptidoglycan synthases // *EMBO Rep.* – 2006. – Vol.7, no 8. – P. 800–805.
- Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking // *Nucl. Acids. Res.* – 2005. – Vol.33. – P. W363–W367.
- Varshavsky A. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis // *Protein Sci.* – 2011. – Vol.20. – P. 1298–1345.
- Yang J., Yan R., Roy A. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction // *Nature Methods.* – 2015. – Vol.12. – P. 7–8.
- Zhang L., Guarente L. Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins // *EMBO J.* – 1995. – Vol.14. – P. 313–320.

Представлено: О.П.Білозоров / Presented by: A.P.Belozorov

Рецензент: Н.І.Буланкіна / Reviewer: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 20.04.2016

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ
журналу «Вісник Харківського національного
університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія»

У серії Вісника публікуються результати досліджень за всіма напрямками біологічних наук.

До публікації приймаються:

- закінчені оригінальні роботи, що досі ніде не видавалися (статті об'ємом 5–10 сторінок друкованого тексту, включаючи перелік посилань);
- описання оригінальних методів та приладів;
- теоретичні та проблемно-оглядові статті об'ємом до 20 сторінок друкованого тексту, включаючи перелік посилань;
- матеріали та повідомлення про події наукового життя;
- рецензії на книги.

Статті друкуються українською, російською та англійською мовами.

Текст експериментальної статті повинен складатися з наступних розділів: **«Вступ», «Методика» («Об'єкти та методи дослідження»), «Результати», «Обговорення»** (можливий об'єднаний розділ **«Результати та обговорення»), «Перелік посилань».**

Текст статті починається з індексу УДК, далі заголовок звичайним шрифтом (**Arial – 12 pt**), ініціали та прізвища авторів (**Arial – 10 pt**), повні назви наукових установ, адреси електронної пошти (**Arial – 9 pt**) – **наявність контактної електронної адреси обов'язкова.**

Анотація розміщується під «шапкою» статті мовою оригіналу (**Arial – 9 pt**). Її обсяг – орієнтовано до 10 рядків. Під анотацією курсивом друкується список ключових слів (не більше 10). Анотація повинна бути побудована як реферат у реферативних журналах та відобразити суть експериментів, основні результати та їх інтерпретацію. Анотація не повинна містити баластні слова, ввідні фрази та неінформативні вислови. Далі друкуються анотації (**Arial – 9 pt**) англійською і російською (якщо стаття написана українською) мовами разом із транскрипціями прізвищ авторів, перекладом назви роботи і відповідними списками ключових слів (**всього в статті мають бути резюме трьома мовами – українською, англійською, російською**).

Розділ **«Вступ»** повинен містити постановку проблеми у загальному вигляді та її зв'язок з важливими науковими або практичними завданнями; короткий аналіз останніх досліджень і публікацій, у яких розпочато рішення даної проблеми, виділення конкретних невирішених питань, яким присвячена стаття, формулювання мети роботи. Інакше кажучи, вступ повинен відповідати на питання: що відомо у даній області; що залишається невідомим; яка задача даної роботи. Бажано, щоб у експериментальних роботах формулюванню мети передувала робоча гіпотеза.

Розділ **«Методика»** повинен містити відомості про об'єкт (об'єкти) дослідження (з обов'язковим вказуванням повних латинських назв видів та авторів класифікації), умови експериментів, аналітичні методи, прилади та реактиви. У цьому ж розділі даються відомості про повтори експериментів, методи статистичного аналізу результатів.

У розділі **«Результати»** необхідно лише описати виявлені ефекти, не коментуючи їх, усі коментарі та пояснення виносяться в обговорення. Викладення результатів не повинно зводитись до переказу вмісту таблиць та графіків, воно повинно відображувати закономірності, які витікають з отриманих даних. Результати рекомендується представляти у минулому часі.

Задачею розділу **«Обговорення»** є узагальнення та інтерпретація результатів, аналіз причинно-наслідкових зв'язків між виявленими ефектами. Отриману інформацію необхідно порівняти з наявними літературними даними та показати її новизну. Обговорення повинно завершуватись відповіддю на питання, яке поставлено у вступі.

Таблиці друкуються у тексті, кожна повинна мати свій заголовок.

Рисунки виконуються у чорному кольорі, розміщуються у тексті. Кожний рисунок повинен мати свій заголовок. На кривих (крім безперервних реєстрацій) повинні бути нанесені експериментальні точки.

Посилання на літературу у тексті подаються у круглих дужках з вказуванням прізвища автора та року видання. Список посилань складається за абеткою, спочатку кирилицею, потім латиницею. Список не нумерується.

Електронні версії статей надсилаються до редакції електронною поштою.

Тексти статей повинні бути виконані у редакторі Ms Word з використанням **шрифту Arial – 10 pt; абзац – 1 см; міжрядковий інтервал – одинарний; поля: верхнє та нижнє – 3,5; ліве та праве – 2 см.** Разом з електронною версією до редакції надсилається тверда копія у двох примірниках, один з яких має бути підписаний авторами.

До статті прикладається рецензія фахівця у даній області досліджень (**зовнішня рецензія**).

На окремій сторінці вказують повністю **імена, по батькові та прізвища усіх авторів, телефони, факси, адреси електронної пошти та повні поштові адреси.**

Стаття, яка надходить до редакції, реєструється та направляється до наукового рецензента, який підписує статтю до друку. При наявності зауважень статтю повертають авторам для доопрацювання. Виправлений варіант (у двох примірниках) автор повинен повернути до редакції разом з початковим варіантом статті та відповіддю на всі зауваження.

Черговість виходу статей визначається датою надходження останнього варіанту.

Редакція залишає за собою право **виправляти та скорочувати рукопис, а також повертати авторам роботи, які не відповідають вимогам редакції.**

Вартість публікації статті розраховується наступним чином: 200 грн за роботу редакції (сума є фіксованою, не залежить від обсягу статті) + 40 грн за публікацію однієї сторінки (помножується на кількість сторінок) + вартість пересилання авторського екземпляра. Оплата приймається після отримання автором інформації про прийняття статті до друку.

Оплата приймається у вигляді поштового переказу на ім'я відповідального секретаря.