

На правах рукописи

Николаева Юлиана Геннадьевна

**Изучение механизмов устойчивости гетеротрофных организмов к неблагоприятным
абиотическим факторам на примере цист *Artemia salina***

05.13.01 – системный анализ, управление и обработка информации (в биологии)

АВТОРЕФЕРАТ

**Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Москва
2008**



Работа выполнена в Государственном учреждении «Государственный океанографический институт»

Научный руководитель

доктор биологических наук, профессор

А В Сыроешкин

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор

С П Сяткин

доктор биологических наук, профессор

Г Н Федорова

Ведущая организация

Тульский Государственный Университет

Защита диссертации состоится «24» июня 2008 г. в 14 час на заседании диссертационного совета Д 212 203 ~~СБ~~ в Российском университете дружбы народов по адресу 117198, Москва, ул Миклухо-Маклая, д 8

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке РУДН по адресу 117198, Москва, ул Миклухо-Маклая, д 6

Автореферат разослан «19» мая 2008 г

Ученый секретарь

Диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Г А. Дроздова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы Для биосистемы, находящейся в неблагоприятных условиях, основной задачей становится поддержание жизнедеятельности с сохранением энергетического потенциала. Главным адаптационным механизмом к неблагоприятным воздействиям считается способность организма входить в состояние анабиоза или диапаузы (Зотова Т Ю и др, 2001). В связи с этим возникает вопрос о наличии действующих энергообразующих процессов в диапаузирующей системе в условиях истощения запасов органических веществ, снижения скорости окислительно-восстановительных реакций и синтеза АТФ ниже предела обнаружения (Макрушин А В и др, 2006, Ершов Ю А, 1983). Предполагается, что метаболические, в том числе мембраносвязанные процессы все же происходят, но они сильно замедлены (Гольдовский А М, 1981, Елифанова О Е и др, 1983). Замедленные мембраносвязанные процессы могут обеспечивать поддержание жизни в диапаузирующей системе. Градиенты разности температур, перепады давления, влажности, действие корпускулярных потоков, вызывается механо-химической генерацией мембранного потенциала, подобно процессам в тельцах Пачини и дисках Мейснера, и могут выступать поддержкой межфазных потенциалов по причине наличия эффектов Соре и Зеебека и считаться второстепенным механизмом поддержания жизнеспособности (Грю К Э и др, 1962, Фролов В А и др, 2004). Значительные трудности в проведении таких исследований вносит отсутствие предсказательных теоретических моделей, поскольку биообъект является сложной системой. В то же время задача изучения устойчивости организма к неблагоприятным условиям становится все более актуальной. Исследование общебиологических закономерностей адаптационных свойств биообъекта, а также влияния на него неблагоприятных температурных режимов и действия облучений различной интенсивности может способствовать развитию фундаментальных представлений различий живого и мертвого. В то же время механизмы устойчивости биообъекта к неблагоприятным условиям изучены недостаточно.

Для изучения устойчивости биообъекта к неблагоприятным абиотическим факторам необходим системный подход (Хадарцев А А, 1999), который основывается на изучении различных уровней организации биообъекта при его взаимодействии с окружающей средой (Хадарцев А А и др, 2000). Биосистема рассматривается как совокупность внутренне организованных структур, развивающихся во времени и объединенных потоками энергии и вещества. Любой компонент биосистемы выполняет определенные функции по отношению к системе в целом, в соответствии со своими качествами и свойствами. Каждая подсистема характеризуется определенными параметрами состояния, в частности, набором белков,

липидов, микроэлементов, своими особенностями распределения зарядов на поверхности, различной проницаемостью мембран. Параметры состояния одной подсистемы отличаются от аналогичных параметров других подсистем и микросистемы в целом. Важной характеристикой каждой из подсистем являются динамические характеристики подсистемы, такие как гидрофобные и полярные взаимодействия, роль водородных связей в динамике подсистем. На уровне подсистемы макромолекул белков, чувствительность к регуляции достигается на основе равновесия сил в пределах белковых глобул. Вода при взаимодействии с белками выступает как двойственный фактор, стабилизирующий за счет гидрофобного взаимодействия и разрыхляющий за счет конкуренции молекул воды из-за образования водородных связей внутри макромолекул (Аксенов С.И., 2004).

В настоящей работе проводилось сопоставление собственных экспериментальных результатов с литературными данными по функционированию организма в нормальных и неблагоприятных условиях на атомном уровне, в частности, при взаимодействии с корпускулярным излучением, на молекулярном уровне, субклеточном (мембранном), клеточном и организменном уровне организации системы.

Важной проблемой является поиск биологических объектов, наиболее адекватно реагирующих на неблагоприятные воздействия и имеющие простую организацию, позволяющую получать информацию о неблагоприятных воздействиях, независимую от таксономического положения организма. Кроме того, важен подбор специфических и высокоинформативных методов исследования влияния различного рода воздействий на биообъект с целью объективизации полученных результатов. При исследовании влияния неблагоприятных факторов на живой организм применение могут найти методы, основанные на оценке физических параметров биотестера.

В качестве биотестера могут быть использованы высокостойкие цисты жаброногих рачков *Artemia salina*. Известно, что цисты *A. salina* применяют для оценки степени загрязнения водной среды, так как толстая оболочка цисты обладает высокой степенью устойчивости (Vos J. et al., 1984, Быкова В.М. и др., 2002, Макрушин А.В. и др., 2006). Благодаря таким свойствам оболочки, циста *A. salina* способна пережить в течение многих лет неблагоприятные условия среды в состоянии анабиоза или диапаузы, когда метаболические процессы в ней сильно замедлены (Урманцев Ю.А., 1979, Студеникина Т.Л., 1986). При этом всегда имеется возможность вступления *A. salina* в цикл с помощью влияния адекватного стимула (Епифанова О.Е. и др., 1988).

Целью настоящей работы явилось изучение механизмов устойчивости диатомовых водорослей *A salina* к неблагоприятным температурным воздействиям и действию ультраслабых нейтронных потоков с различной интенсивностью

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние низких температур на всхожесть цист *A salina*
2. Оценить концентрацию свободных радикалов, парамагнитных ионов и подвижность фракции протонов в цистах *A salina* в условиях низких температур в течение длительного периода времени
3. Изучить влияние высоких температур на всхожесть цист *A salina*
4. Оценить влияние нагревания (от +25°C до +110°C) на подвижность фракции протонов в цистах *A salina*
5. Оценить влияние искусственного корпускулярного (нейтронного) потока на подвижность фракции протонов в цистах *A salina*, концентрацию свободных радикалов и парамагнитных ионов
6. Провести системный анализ реакции цист *A salina* как биогестера на действие радиационного излучения в условиях космического полета на спутнике и трансконтинентального авиаперелета

Научная новизна. Впервые был использован системный анализ при изучении механизмов устойчивости цист *A salina* к неблагоприятным условиям. Модельный объект изучали как иерархическую систему, проводилось сопоставление собственных экспериментальных результатов с литературными данными по функционированию организма в нормальных и неблагоприятных условиях на атомном (при взаимодействии с корпускулярным излучением), молекулярном и организменном уровнях организации системы. В работе впервые показано, что при воздействии на цисты *A salina* высокой температуры (+110°C) живые цисты нагреваются медленнее, чем мертвые. Впервые отмечено, что в цистах, после лиофильного высушивания, остается 3 – 4% (от веса образца) подвижной фракции протонов, которые принадлежат водной и липидной фракциям. Впервые для выяснения механизмов устойчивости цист изучались возможные механизмы выживания протонной подвижности, концентрации свободных радикалов. Впервые изучена роль корпускулярных потоков с использованием высокоинформативных методов ядерного магнитного резонанса – спиновое эхо и электронного парамагнитного резонанса.

Научно-практическая значимость работы

Научная значимость работы заключается в том, что системный анализ механизмов выживаемости биообъекта при неблагоприятных воздействиях окружающей среды

необходимо для понимания и контролирования этих процессов, так как они являются универсальными для всех гетеротрофов. Полученные данные о наиболее значимых механизмах устойчивости биотестера к неблагоприятным космогеофизическим воздействиям могут иметь определенное значение для понимания и анализа этих процессов у человека. Практическая значимость работы заключается в расширении знаний о выживаемости цист *A salina* в неблагоприятных условиях, поскольку цисты культивируются как основной белковый источник питания для многих гетеротрофных организмов, а также при глубокой переработке цист получают препараты и вещества, используемые в медицине, производстве высоко стимулирующих биопрепаратов, иммуномодуляторов корректирующих обмен веществ у человека.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Представлено комплексное системное исследование механизмов устойчивости диапаузирующих цист *A salina* к различным неблагоприятным воздействиям – резким колебаниям температур и действию корпускулярных (нейтронных) потоков с различной интенсивностью при сравнении реакций организма на атомно-молекулярных и организменном уровнях. Одновременное определение подвижности протона в условиях ядерного магнитного резонанса - спинового эха, интегральной кинетики свободно радикальных реакций в клетках, неравновесной кинетики теплопереноса в биомассе могут служить новой совокупностью критериев различения живого и мертвого у организмов, находящихся в состоянии метаболического покоя, анабиоза.
2. С помощью метода ядерного магнитного резонанса (спиновое эхо) было показано, что движение фракции протонов в цистах *A salina* составляет 3 – 4% (от веса образца) и принадлежит липидной и водной фракциям, и эта подвижность одинакова как в опытных, так и в контрольных образцах.
3. Выявленную способность цист *A salina* охлаждаться при нагревании, можно отнести к защитно-приспособительным механизмам устойчивости при неблагоприятных воздействиях.
4. Способность цист, находящихся в неблагоприятных условиях низких температур и интенсивного корпускулярного (нейтронного) потока, сохранять концентрацию свободных радикалов в пределах физиологических значений свидетельствует об измеряемом протекании метаболических процессов, связанных с антиоксидантной защитой.
5. Показано, что облучение цист *A salina* корпускулярным (нейтронным) потоком, приводит к изменениям внутренней протонной подвижности в мертвых цистах *A salina* при стабилизации этого показателя у живых цист.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на Международной гидробиологической конференции «Водные экосистемы и организмы – 6» (Москва, 2005), на Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов – 2006» (Москва, 2006), на Международной гидробиологической конференции «Водные экосистемы и организмы – 7» (Москва, 2006), на VII международной научно-практической конференции «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2006), на VI международной научной конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы спортивной медицины, лечебной и физической культуры, физиотерапии и курортологии» (Москва, 2007), на II научной конференции с участием стран СНГ «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» (Петрозаводск, 2007), на международной конференции «Развитие идей А.Л. Чижевского» (Санкт-Петербург, 2007), на XV Всероссийской молодежной научной конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2008)

Публикации: по теме диссертации опубликовано 12 печатных работ

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 111 страницах и состоит из следующих разделов: обзор литературы, методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, библиографического списка 167 источников, из них 125 на русском и 42 на иностранных языках и приложения. Работа содержит 4 таблицы, 20 рисунков

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования в настоящей работе являются диапаузирующие активированные и неактивированные толстоскорлуповые цисты *A salina*, выращенные производителем Алтайского края ООО «Арсал» в 2005 году и прошедшие высушивание на производстве

Определение состояния подвижной фракции протонов в цистах *A salina* проводили методом ядерного магнитного резонанса (Фаррар Т и др., 1973). С помощью этого метода регистрировалась амплитуда сигнала спинного эха и время спин-спиновой релаксации ядер – T_2 . Метод позволяет получить информацию о количестве и качестве подвижных протонов, дающих вклад в резонанс и принадлежащих водной, белковой или липидной фракциям системы. Это один из наиболее эффективных методов структурного анализа молекул. В работе были использованы две ЯМР-установки низкого (20 МГц – ЯМР-ХЛ-100) и высокого (600 МГц

– *Avance 600*) разрешений Точность измерений составляла не хуже 7% Линейность работы установки контролировалась по эталонному водному раствору $CuSO_4$

Определение концентрации свободных радикалов и парамагнитных ионов в цистах *A salina* проводили с использованием электронного парамагнитного резонанса как основного метода анализа количественных и качественных закономерностей образования свободных радикалов и парамагнитных ионов Измерения проводились на спектрометре 3-х сантиметрового диапазона *PЭ-1307* Сигналы свободных радикалов рассчитывались при комнатной температуре и мощности СВЧ – 0,5 мВт, а парамагнитных ионов – 10 мВт Точность измерений составляла не хуже 10% Постоянная времени – 0,1 с, напряженность магнитного поля для свободных радикалов составляла – 3340 ± 10 Гс, для парамагнитных ионов – 3340 ± 150 Гс

Метод определения влияния высоких и низких температур на цисты *A salina*

Влияние низких температур. Образцы цист *A salina* помещали в холодильную камеру, с температурой -10°C , максимально на 70 дней Через каждые 14 суток 70-ти дневного эксперимента часть образцов вынимали, промывали от солей водой и осаждали центрифугированием Затем их лиофильно высушивали при -20°C в условиях вакуума 10^{-3} мм рт ст Контролем служили цисты, не подвергавшиеся воздействию низких температур Опыты ставили в трех параллельных пробах и повторяли трижды

Влияние высоких температур. Эксперименты проводились в ячейке, нагреваемой тосолом из жидкостного термостата фирмы “*Termex*” Контроль за стационарным значением температуры и однородностью нагрева по всей площади ячейки осуществлялся с помощью электротермометра “*VT-01*” и ртутных термометров с одинаковой температурной шкалой Ячейка была разработана и выполнена на базе ГУ “ГОИН”, Москва Навески живых и мертвых цист *A salina* помещали в ячейки и нагревали систему до $+110^\circ\text{C}$ Через каждые 10 минут в течение 3 часов фиксировали данные термометров и отбирали пробы на выклев

Биологические эксперименты по развитию цист проводили с использованием камеры Богарова и водных растворов с солевым составом собственной разработки, $pH = 8,2$ (Матвеева И С и др, 2004) Наблюдение за вылуплением *A salina* велось визуально, и их количество подсчитывалось с помощью бинокулярного микроскопа Контрольные мертвые образцы цист экспонировали в сушильном шкафу при температуре $+150^\circ\text{C}$, в течение 9 часов Опыты ставили в трех параллельных пробах и делали 9 повторов

Облучение цист *A salina* искусственным потоком тепловых нейтронов проводили на установке, которая состояла из источника нейтронов (н) *ИНК1-06* ^{252}Cf с активностью потока – $1,42 \cdot 10^4$ н/с ($\pm 8\%$), полиэтилена в качестве замедлителя нейтронов, кюветы для цист

и ^3He -счетчик нейтронов типа *СИ14Н*. Детектор нейтронов через усилитель-дискриминатор был подсоединен к устройству счета импульсов. Расчет плотности потока нейтронов от источника ^{252}Cf , который имеет мощность эквивалентную дозе образца и энергетического спектра, проводили по методу Монте-Карло (Матвеева И С и др., 2004)

Определение влияния фоновых воздействий в воздушном, водном и земном пространствах на цисты *A salina*

Эксперименты в стратосфере по природному облучению живых и мертвых цист *A salina* проводили на орбитальном биоспутнике КА «Фотон-М3». Цисты были помещены в корпус космического аппарата в условия атмосферы. Полет продолжался 12 суток. Контролем служили цисты, находящиеся в рабочей лаборатории, на уровне второго этажа капитального пятиэтажного кирпичного строения ГОИН, Москва.

Эксперименты в тропосфере по природному облучению живых и мертвых цист *A salina* проводили при трансконтинентальных авиаперелетах на борту воздушного судна «АН-12», вылетающего по маршруту Москва – Екатеринбург – Новосибирск – Чита – Хабаровск – Петропавловск-Камчатский – Москва. Параллельно с экспериментами по корпускулярному (нейтронному) облучению проводили регистрацию нейтронного потока специальным счетчиком *СРПН4* производства НИИИТ Минатома на земной поверхности (Плотникова Н.В. и др., 2007). Полет проходил на максимальной высоте 11600 м с посадками в пунктах назначения, длительность всего полета составила 10 часов.

Эксперименты в Атлантическом океане по природному облучению живых и мертвых цист *A salina* на трансконтинентальном меридиональном разрезе проводили с борта судна «Академик Йоффе», следовавшего по маршруту Балтийск – Ушуга (Огненная Земля) – Балтийск в течение 150 суток.

Эксперименты в условиях различной этажности по природному облучению живых и мертвых цист *A salina* проводили в подвальном и чердачном помещениях капитального пятиэтажного кирпичного строения (ГОИН, Москва), в течение 7 суток. В лесном биоценозе цисты экспонировали в течение 16 суток.

Данные обрабатывали с помощью статистических методов Q -теста и распределения Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Описание препаратов цист *A salina*, их физиологические характеристики

В качестве биообъекта были взяты активированные и неактивированные живые и мертвые диапаузирующие сухие цисты, находящиеся на стадии ранней гастрουλации. Относительная влажность образцов составила 2,7%.

Механизмы устойчивости цист *A salina* к неблагоприятным абиотическим факторам

1. Влияние низких температур на цисты *A salina*

Для оценки всхожести цист в условиях длительного промораживания, неактивированные сухие цисты помещали в холодильник при постоянной температуре -10°C в течение 70-и суток. Их доставали порциями, промывали, осаждали центрифугированием и проращивали по 100 штук от каждого забора в искусственной морской воде. Контролем служили цисты, не подвергнутые воздействию низких температур. При помещении в морскую воду через 24 часа и далее до 70-и суток они имели всхожесть 5 – 10%. Промораживание неактивированных цист при -10°C в течение 47-х суток выявили только 2% всхожести цист, а к 70-м суткам инкубации наблюдалась их максимальная всхожесть равная 92%.

Таким образом, нами было определено, что длительное нахождение цист при средненизкой температуре приводит к резкому максимальному скачку их всхожести на 70-е сутки промораживания. Наши данные согласуются с литературными данными, где отмечается, что в природе активация цист *A salina* происходит в зимний период времени, когда у береговой линии соленых озер цисты находятся в диапаузе на протяжении 70-и дней. Стимулирующим фактором при продуцировании диапаузирующих (зимних) цист *A salina* обычно становится температурный фактор при сочетании с повышением концентрации солей (Студеникина Т Л, 1986).

В эти сроки промораживания в контрольных и опытных образцах цист *A salina* нами изучалась концентрация парамагнитных ионов (Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) и концентрация свободных радикалов методом ЭПР-спектроскопии. Концентрация парамагнитных ионов у активированных в течение 70-е суток цист при -10°C выявила следующие закономерности. На рисунке 1 представлена концентрационная зависимость парамагнитных ионов от длительности промораживания цист *A salina*.

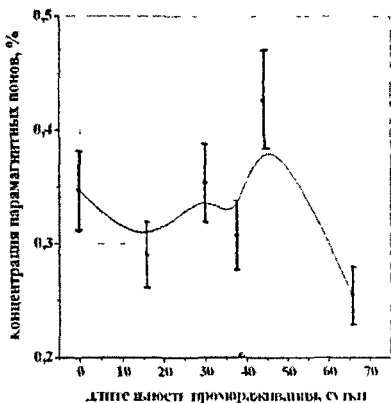


Рис. 1 Влияние длительности промораживания цист *A salina* при -10°C на концентрацию парамагнитных ионов ($n = 7$, $\rho = 0,95$)

Концентрация парамагнитных ионов, измеренная в опытном (активированном) образце цист на 70-е сутки промораживания в 2,5 раза ниже, чем в контрольном образце. В диапазоне от 17 до 47 суток концентрация парамагнитных ионов не превышает контрольных значений. Эти данные согласуются с ответом цист на их всхожесть при длительном промораживании, поскольку значение снижения концентрации парамагнитных ионов в опытном образце также наблюдается на 70-е сутки.

Аналогичным образом производилось измерение концентрации свободных радикалов в опытном образце цист, замороженном при -10°C в течение 70-и суток, которая не отличалась от контрольных значений. Это свидетельствует о сбалансировании свободнорадикальных процессов в этих экспериментальных условиях. Возможно, это связано с мощной защитной эндогенной антиоксидантной системой и устойчивостью мембранных образований цист *A salina*.

Таким образом, достоверно зафиксирован ход метаболических процессов в цисте в период ее низкотемпературной активации. Протекание метаболических реакций в цисте при низкотемпературной активации приводит к изменениям степени окисления элементов, в результате исчезает их парамагнетизм, что и регистрируется спектрометром. Такое явление возможно только при наличии протонной подвижности в системе. Эти данные явились основанием для изучения подвижности фракции протонов в цистах *A salina* при их замораживании. Поэтому нам представлялось важным изучить влияние высоких температур на содержание подвижной фракции протонов в цистах *A salina* и на их всхожесть.

2. Влияние высоких температур на цисты *A salina*

Живые и мертвые цисты (контроль) помещали в ячейку в диапазоне температур от $+25^{\circ}$ до $+110^{\circ}\text{C}$ в течение 175 минут. Как видно из рисунка 2а на каждом из временных этапов эксперимента от 1-й до 175-й минуты кинетика нагрева биомассы мертвых цист *A salina* увеличивалась по экспоненте пропорционально увеличению температуры термостата ячейки. Повышение температуры биомассы живых цист не соответствовало повышению температуры биомассы мертвых. Живые цисты нагревались в аналогичном диапазоне времени медленнее на $1^{\circ} - 5^{\circ}\text{C}$, что достоверно при данных условиях эксперимента. Всхожесть образцов цист, после нагрева в ячейке, на 30-й минуте эксперимента составила 90%, на 60-й минуте – 3%, а на 90-й минуте – 0%.

Таким образом, наблюдается эффект «самоохлаждения» живых цист и найдены условия их термоустойчивости – абсолютный максимум времени самоохлаждения живых образцов цист составляет 70 ± 15 мин в диапазоне температур от $+40^{\circ}\text{C}$ до $+47^{\circ}\text{C}$, что

соответствует, разнице температур между термостатом и биомассой $\Delta T = 45^\circ \pm 10^\circ\text{C}$ при выбранных условиях эксперимента (рис. 2.б).

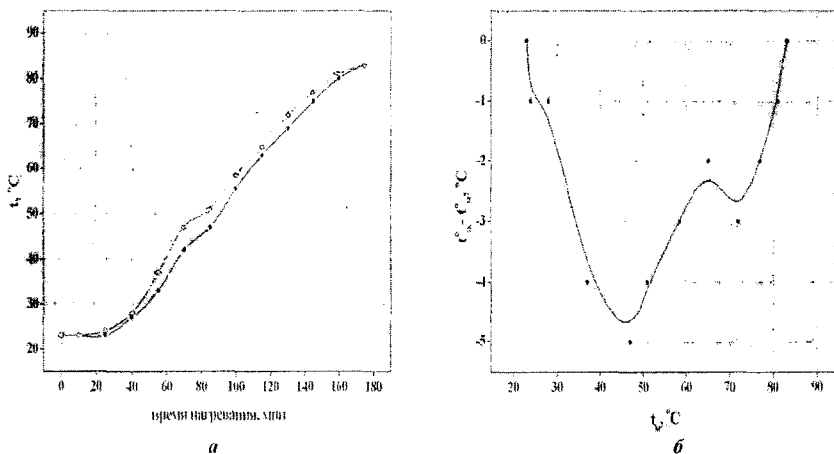


Рис. 2. Зависимость температуры биомассы цист от их времени нагревания: а - ответ живых (черная линия) и мертвых (серая линия) цист *A.salina* на нагревание при постоянной массе и одинаковой насыщенной плотности; б - зависимость разности температуры биомассы живых цист (T_l) и температуры биомассы мертвых цист (T_m) от температуры биомассы мертвых цист (T_m) *A.salina* ($n = 9$, $\rho = 0,99$).

Вероятно, высокие температуры способствуют к перераспределению элементов в системе, что приводит к возникновению затухающих колебательных процессов в олигомерных мембранных ферментах (Романовский Ю.М. и др. 2002), которые resultируются в эффекте охлаждения мембранных компонентов клетки. Это – возможный механизм защиты от тепловой денатурации белков, который реализуется при достаточной биомассе цист *A.salina*. Индуцированные температурой изменения структуры подвижных протонов изучено нами по времени спин-спиновой релаксации протонов методом ЯМР-спиновое эхо.

3. Изменение подвижности фракции протонов цист *A.salina*, индуцированные высокой и низкой температурой

Изучение подвижной фракции протонов в живых и мертвых цистах *A.salina*, после экспериментов по их краткосрочному замораживанию в токе жидкого азота и нагреванию в термостатируемой ячейке, представлены на рисунке 3. Состояние подвижной фракции протонов оценивали по времени спин-спиновой релаксации протонов – T_2 метода ЯМР-спиновое эхо.

На рисунке 3 показано, что для нормальной жизнедеятельности цист *A. salina* оптимальная температура внешней среды должна находиться в диапазоне от -15°C до $+35^{\circ}\text{C}$, при этом время спин-спиновой релаксации протонов (T_2) в цистах равно $100 \text{ мс} \pm 15 \text{ мс}$, а температура биомассы находится в пределах от 0° до $+20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Выживаемость цист подтверждается данными о всхожести опытных образцов. В случае если условия внешней среды ухудшаются, то цисты способны выживать в следующих температурных пределах: от -20°C до -65°C и от $+70^{\circ}\text{C}$ до $+110^{\circ}\text{C}$. При этом, когда температура биомассы имеет экстремально отрицательные значения, T_2 находится в промежутке от 50 мс до 100 мс, и экстремально положительные значения – от 70 мс до 95 мс.

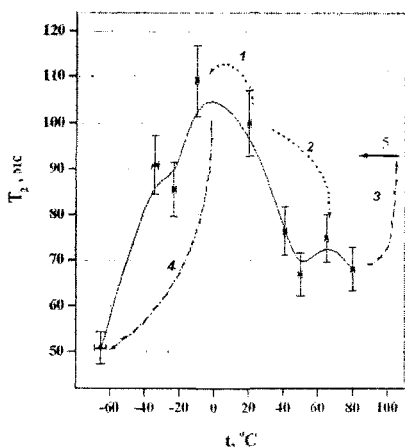


Рис. 3. Время спин-спиновой релаксации протонов, как функция температуры биомассы цист *A. salina*. Прерывистыми стрелками показаны оптимальные (1, 2) и неблагоприятные (3, 4) температурные режимы. Стрелкой (5) показано значение T_2 у мертвых цист, достигаемое длительной инкубацией (175 мин.) при $+110^{\circ}\text{C}$, которое было принято за контрольное значение ($\rho = 0,95$).

Таким образом, при оптимальных условиях среды протонная подвижность в живых цистах имеет самые высокие значения. В случае если условия среды становятся неблагоприятными и даже экстремальными – протонная подвижность в цистах уменьшается, что свидетельствует о наличии более прочных протонных связей в живых цистах по сравнению со значением мертвых образцов. Влияние промораживания и нагревания приводят к изменениям гидратации в цистах, а результатом этих изменений является новое равновесие сил в пределах биоструктур цисты как определяющее условие ответа биосистемы на неблагоприятное воздействие. Движение фракции протонов в цисте происходит за счет ослабления гидрофобных взаимодействий в их макромолекулах. Воздействие воды на биоструктуры цисты определяется гидратацией полярных групп, гидрофобными эффектами и возможностью внедрения молекул воды в водородные связи внутри макромолекул и мембранных образований. В результате такого воздействия молекулы воды определяют

равновесие сил в пределах биоструктур, что является важным условием в устойчивости системы к неблагоприятным воздействиям

Помимо вариации температурных условий нами было изучено действие на цисты другого физического фактора корпускулярного излучения (тепловых нейтронов), изменяющегося на порядки у поверхности Земли в зависимости от высоты над уровнем моря и космогеофизических факторов (в том числе солнечных вспышек) К нейтронному ультраслабому излучению (тепловых энергий) крайне чувствительны все водород-содержащие системы, включая воду и живые организмы

4 Влияние корпускулярного (нейтронного) потока на метаболические характеристики цист *A salina*

При воздействии искусственного нейтронного потока, создаваемого источником нейтронов ИНК-06 с высокой активностью на живые цисты *A salina*, изучено состояние подвижной фракция протонов методом ЯМР-спиновое эхо, концентрации свободных радикалов и парамагнитных ионов методом ЭПР-спектроскопии Контролем служили не облученные живые и мертвые цисты (Табл 1)

Таблица 1

Метаболические характеристики живых и мертвых цист *A salina* после облучения их искусственным нейтронным потоком с активностью $1,42 \cdot 10^4$ н/с

Группа	Время спин-спиновой релаксации протонов T_2 , %	Концентрация свободных радикалов, %	Концентрация парамагнитных ионов ($Mn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}$), %
Контрольная, а) живые цисты	$100,0 \pm 1,7$	$14,1 \pm 1,4$	$0,14 \pm 0,1$
Контрольная, б) мертвые цисты	$58,3 \pm 1,0^*$	$18,2 \pm 1,8$	$0,08 \pm 0,1^*$
Опытная, в) живые цисты, облученные искусственным нейтронным потоком	$150,1 \pm 2,5^{**}$	$15,3 \pm 1,5$	$0,11 \pm 0,1^{**}$

* достоверность различий измеряемого параметра T_2 в контрольной группе мертвых цист по отношению к контрольной группе живых цист ($p = 0,95$)

** достоверность различий измеряемого параметра T_2 в опытной группе по отношению к контрольной группе живых цист ($p = 0,95$)

В таблице 1 показано, что в опытных живых цистах (в), после их облучения высокоинтенсивным искусственным нейтронным потоком, на 61% увеличивается протонная подвижность по сравнению с мертвыми контрольными образцами и на 33% по сравнению с живыми контрольными образцами цист (а) Это свидетельствует об особых условиях

изменения состояния вещества в живых цистах при их облучении и об ускорении метаболических процессов в системе В этих условиях концентрация свободных радикалов во всех трех изучаемых образцов (а, б, в) достоверно не различалась между собой, что свидетельствует о стабилизации свободнорадикальных процессов

Измерение концентрации парамагнитных ионов проводилось в образцах (а, б, в) и в аналогичных условиях В контрольном образце живых цист (а), концентрация составила 14% от веса образца, в образце мертвых цист (б) - 8% от веса образца и в облученном образце живых цист (в), концентрация парамагнитных ионов составила 11% от веса образца, что достоверно выше концентрации в контроле мертвых цист По-видимому, их резистентность к облучению обусловлена особенностями структуры их оболочек и активностью защитной антиоксидантной системы После облучения нейтронным потоком образцов цист (в) гистологических и морфологических изменений нами не обнаружено (Матвеева И С и др, 2004)

Таким образом, было показано, что активное облучение нейтронным потоком способно оказывать влияние на общую подвижность в диapaузирующем организме, у которого, изначально, все процессы сильно замедлены Эти факты демонстрируют прямое воздействие облучения на живую систему В литературе приведены данные исследований по облучению цист *A salina* искусственным потоком тепловых нейтронов Облучение привело к 4-кратному ускорению развития науплиусов, а также к изменению соотношения в элементных профилях по марганцу и мышьяку, тогда как соотношения других элементов (алюминий, хром, никель, медь, кадмий, свинец) у опытных образцов цист *A salina* осталось неизменным Также обнаружено различие между поглощением/рассеянием тепловых нейтронов живыми и мертвыми цистами (Матвеева И С и др, 2004) Следовательно, искусственное высокоактивное нейтронное облучение способно оказывать системное положительное воздействие на цисты *A salina*, которое может тормозить или наоборот активизировать в ней генетические и физиологические процессы, такие как механохимическая генерация оболочки Вместе с тем, энергия природного (фонового) нейтронного потока разной интенсивности, возрастающая с высотой, очень высока Попадая в живые системы, нейтронный поток может вызывать ряд интенсивных физико-химических процессов в локальных объемах, таких как ионизация и образование новых элементов, приводя в отдельных случаях к деструкции системы (Гак Е З и др, 2007) Поэтому, нам представилось значимым зарегистрировать ответ живых и мертвых цист *A salina* на облучение их природным (фоновым) естественным потоком тепловых нейтронов на различных высотах

5. Циста *A.salina* как биотестер «скрытых» воздействий на человека

Эксперименты по природному естественному облучению живых и мертвых цист *A.salina* нейтронным потоком проводили в стратосфере на орбитальном биоспутнике, в тропосфере при трансконтинентальном авиаперелете, над уровнем моря при трансатлантическом круизе и в разных условиях на земной поверхности. Далее в лабораторных условиях было изучено состояние подвижной фракции протонов в живых и мертвых цистах *A.salina* методом ЯМР-спиновое эхо (рис. 4).

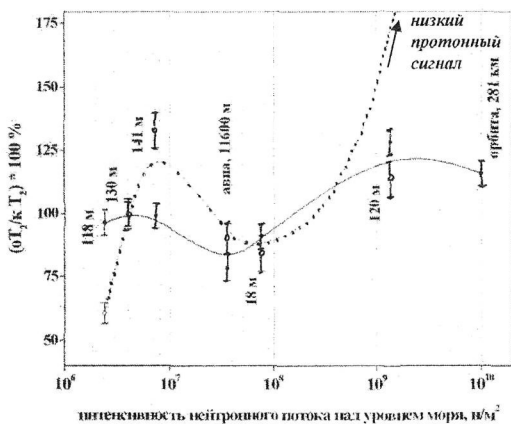


Рис. 4. Зависимость времени релаксации протонов живых (черная линия) и мертвых (прерывистая линия) цист *A.salina* от интенсивности нейтронного потока на различных высотах. За 100% взят контрольный образец цист, который находился в нормальных условиях лаборатории на высоте 130 м над уровнем моря.

На рисунке 4 показано, что не зависимо от пребывания в стратосфере (281 км), в тропосфере (11600 м), в условиях различной этажности (от 118 м до 141 м) и над уровнем моря (18 м) подвижность фракции протонов в живых цистах достоверно не изменялась и имела пределы от 105 мс до 147 мс, что не отличалось от контрольных значений. В отличие от живых цист у мертвых образцов, облученных природным потоком в идентичных условиях, в большинстве случаев наблюдаются различия в протонной подвижности между опытными и контрольными образцами. В мертвых цистах состояние фракции протонов в не зависимости от высоты изменяется следующим образом: на высоте 118 м над уровнем моря, время спин-спиновой релаксации протонов составило 82 мс, что достоверно ниже контрольных значений; на высоте 120 м, время релаксации составило 154 мс, что достоверно выше контрольного времени релаксации; над уровнем моря время релаксации протонов равнялось 114 мс, что так же что достоверно ниже контроля; на 141 м, время релаксации составило 180 мс, что достоверно выше контрольного времени релаксации; на высоте 11600 м, время релаксации составило 122 мс, что не отличалось от контрольного времени релаксации; на высоте 281 км наблюдался слабый протонный сигнал, который был недетектируем установкой. Полученные

данные свидетельствует о более чувствительной системе цисты к облучению после наступления ее гибели

Таким образом, по времени релаксации протонов живые цисты, экспонируемые на различных высотах от уровня моря до Земной орбиты, оказываются стабильнее, чем мертвые. Нестабильность протонной подвижности в мертвых образцах объясняется деструкцией всей системы на макромолекулярном уровне. Возможно, тепловые нейтроны выступают в роли раздражителя по отношению к внутренней среде покоящихся биосистемы, тем самым, помогая ей находиться в анабиозе продолжительный период. При этом система не нуждается в расходе собственной энергии.

Следовательно, комбинацию препаратов сухих живых и мертвых цист *A. salina* можно рассматривать в качестве биотестера интенсивного нейтронного потока воздействующего на человека при высотных полетах. Биологический феномен ответа организма мертвой цисты *A. salina* является чувствительным показателем для неблагоприятного эффекта на человека, вызванного космическим и авиа- полетом. Говоря о проблеме биологических эффектов радиоактивного фона, особое внимание следует уделять космическому излучению, его вариациям и опасности для человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе был проведен системный анализ экспериментальных исследований с целью изучения механизмов устойчивости диапаузирующих цист *A salina* к неблагоприятным факторам резким колебаниям температур и воздействию нейтронного потока различной интенсивности. Переход к торможению процессов жизнедеятельности цист *A salina*, при вхождении в анабиоз, меняет характер устойчивости их биологических структур и организма в целом. Устойчивость биоструктур цист должна обеспечиваться за счет их высокой стабильности в состоянии покоя и лабильности при своем активном функционировании (при выходе из анабиоза) в присутствии воды, а также за счет значительного снижения температуры и способности противостоять другим повреждающим факторам (радиация, кислород и т.д.). В качестве возможного адаптационного механизма устойчивости цист *A salina* изучено действие высоких и низких температур, отражающее реальные неблагоприятные условия покоящихся цист *A salina* в зимний и летний периоды, а также действие на них корпускулярного (нейтронного) излучения.

Сохранение способности к выживанию в различных неблагоприятных температурных режимах свидетельствует об организменной устойчивости цист, поскольку устойчивость представляет собой прочность биосистемы по отношению к внешним условиям. Снижение времени релаксации протонов при низкой температуре (-65°C) свидетельствует об упрочнении протонных связей в живой биосистеме. Можно предположить, что подвижность протонов обеспечивается следующими процессами: с одной стороны, при низкой температуре уменьшается вклад гидрофобных взаимодействий в структуре белков, а с другой стороны, увеличивается концентрация солей в системе, что приводит к увеличению ионной силы раствора. Сохранность состояния подвижных протонов и сбалансированность свободнорадикальных процессов при промораживании цист, возможно, свидетельствует о наличии мощной защитной эндогенной антиоксидантной системой и устойчивостью мембранных образований и является защитным механизмом, позволяющим выживать *A salina* в естественных условиях среды обитания. Устойчивость проявляется в сопротивляемости биосистемы по отношению к изменению внешних условий и к действию неблагоприятных факторов среды. При анабиотических температурах в макромолекулярных соединениях и организме цисты *A salina* происходят структурные перестройки, отличающиеся от процессов, протекающих в ее организме в активном состоянии. Такое явление возможно только при наличии подвижной фракции протонов в системе. Фракция подвижных протонов в организме *A salina* способствует его устойчивости к низким температурным воздействиям. Вместе с тем известно, что в летнее время года при повышении температуры до $+100^{\circ}\text{C}$ на солнце у уреза

воды цисты *A salina* остаются жизнеспособными. Было обнаружено явление изменения времени релаксации подвижной фракции протонов и эффект «самоохлаждения» живых цист после воздействия на них высоких температур (+70°C). Наши данные подтверждают ранее проведенное исследование (Матвеева И С и др., 2004) по изучению влияния высоких температур на систему. В этих исследованиях показано, что температуры способствуют к перераспределению элементов в системе и это приводит к возникновению затухающих колебательных процессов в олигомерных мембранных ферментах, результирующихся в эффекте охлаждения мембранных компонентов клетки. Возможно, при самоохлаждении в цисте *A salina* возникают колебательные процессы, что может являться механизмом защиты от тепловой денатурации белков. При облучении образцов живых цист *A salina* искусственным потоком тепловых нейтронов подвижность протонов водной и липидной фракций в образце увеличивается. Эти данные важны в биологическом аспекте, они подтверждают мнение других исследований (Матвеева И С и др., 2004), что даже слабые потоки тепловых нейтронов являются «посредниками», позволяющими живым организмам ocupar целый ряд космофизических событий, в дополнение к известным климатическим факторам. С нашей точки зрения корпускулярное излучение является фактором, оказывающим прямое влияние на функционирование живых систем на всех уровнях организации от простейших до человека.

Объективизация результатов, полученных в данной работе, оказалась возможна при использовании высокоинформативных биофизических импульсных методов электронного парамагнитного и ядерного магнитного резонансов. С помощью этих методов были получены объективные данные о том, что цисты, характеризуются наличием сбалансированной системой защиты к неблагоприятным условиям, сформировавшимся в ходе эволюции.

Таким образом, в настоящей работе помимо конкретных вопросов, касающихся физиологического аспекта цист в различных неблагоприятных условиях, нами были сделаны попытки оценить глобальные механизмы устойчивости гетеротрофов к неблагоприятным абиотическим факторам, включая компоненты биосферы и космофизические факторы, что определяет системность нашего исследования.

ВЫВОДЫ

1. Комбинирование методов исследования на ядерном (ЯМР-спиновое эхо), атомном (ЭПР-спектроскопия) и организменном уровне позволяет различать живые и мертвые цисты *A salina*, и количественно определять скорость их метаболизма в период диапаузы
2. Оптимальным сроком для максимальной всхожести цист являются 70-е сутки в условиях их средненизкого (-10°C) промораживания, когда в цисте происходит снижение концентрации парамагнитных ионов при сбалансированности свободнорадикальных процессов, и неизменность подвижности липидной и водной фракции протонов
3. Оптимальными условиями для максимально высокой всхожести сухих цист *A salina* при их нагревании является температура равная +40°C и длительность нагревания – 60 минут
4. Нагревание (от +25°C до +110°C), как живых, так и мертвых цист *A salina* не приводит к уменьшению подвижности фракции протонов, в идентичных условиях сухие живые цисты нагреваются медленнее мертвых
5. В цистах *A salina*, подвергавшихся облучению искусственным корпускулярным (нейтронным) потоком (с активностью до 20 н/с м²) снижается концентрация парамагнитных ионов, возрастает подвижность фракции протонов и не изменяется концентрация свободных радикалов
6. Системный анализ показал, что при радиационном облучении живых цист *A salina* на орбитальном спутнике и в тропосфере при авиapolете в них не меняется подвижность фракции протонов, в то время как в мертвых образцах эта подвижность меняется пропорционально активности ионизирующего излучения

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1 Николаева Ю Г, Николаев Г М, Фролов В А, Сыроешкин А В Изучение состояния воды у покоящихся активированных яиц *Artemia salina* L с помощью метода ЯМР-спиновое эхо // Труды научной конференции «Водные экосистемы и организмы – 7» – Москва – 2005 – С 70-71
- 2 Николаева Ю Г, Николаев Г М, Фролов В А, Сыроешкин А В, Бруй С В, Царева Г А. Влияние низких температур на цисты *Artemia salina* в течение их активации // *Ecological studies, hazards, solutions* – Москва – 2006 – С 39
- 3 Николаева Ю Г, Сыроешкин А В Некоторые особенности выживания при высоких температурах покоящихся форм *Artemia salina* // XIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», - Москва – 2006 – С 169-170
- 4 Плотникова Н В, Николаева Ю Г, Фролов В А, Лапшин В Б, Сыроешкин А В К вопросу о корпускулярном облучении человека на больших высотах // VII научно-практическая международная конференция «Здоровье и образование в XXI веке» – Москва – 2006 – С 397
- 5 Николаева Ю Г, Николаев Г М, Тимофеев К Н, Фролов В А, Сыроешкин А В Изучение состояния воды у покоящихся форм *Artemia salina* // Вестник РУДН – 2007 – № 1 – С 5-8
- 6 Николаева Ю Г, Плотникова Н В, Зенченко Т А, Мерзлый А М, Лапшин В Б, Фролов В А, Сыроешкин А В Дозиметрия корпускулярных потоков и влияние облучения на живые организмы во время авиaperелетов Москва – Северный полос и Москва – Камчатка, (проблемы экстремального туризма и перемещения спортсменов) // VI международная научная конференция студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы спортивной медицины, лечебной и физической культуры, физиотерапии и курортологии» – Москва – 2007 – С 44
- 7 Плотникова Н В, Лапшин В Б, Николаева Ю Г, Фролов В А, Сыроешкин А В Санаторное и СПА-лечение и поток тепловых нейтронов исследование поля и модельные эксперименты // VI международная научная конференция студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы спортивной медицины, лечебной и физической культуры, физиотерапии и курортологии» – Москва – 2007 – С 45
- 8 Николаев Г М, Николаева Ю Г, Савельев И Б, Тимофеев К Н Механизм адаптации цист покоя *Artemia salina* в экстремальных условиях // II научная конференция с участием стран СНГ «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов» – Петрозаводск – 2007 – С 108
- 9 Николаева Ю Г, Плотникова Н В, Сыроешкин А В, Фролов В А, *Artemia salina* как биосенсор вторичных корпускулярных потоков // Материалы международной конференции «Чтения Чижевского» – Санкт-Петербург – 2007 – С 119
- 10 Плотникова Н В, Лапшин В Б, Загров В Ю, Колесников М В, Латаев М Р, Николаева Ю Г, Зенченко Т А, Бекетов В В, Мерзлый А М, Сыроешкин А В Нейтронное поле Земли макромасштабная, мезомасштабная и микромасштабная вариабельность // Материалы международной конференции «Чтения Чижевского» – Санкт-Петербург – 2007 – С 106-108
- 11 Николаева Ю Г Адаптационный механизм выживания толстоскорлуповых цист *Artemia salina* в экологических условиях среды обитания // XV всероссийская молодежная научная конференция «Актуальные проблемы биологии и экологии» – Сыктывкар – 2008 – С 116-118
- 12 Николаева Ю Г, Фролов В А, Сыроешкин А В Влияние низких температур на диапаузирующие цисты *Artemia salina* // Естественные и технические науки – 2008 - № 3 – С 21-25

Николаева Юлиана Геннадьевна (Россия)

Изучение механизмов устойчивости гетеротрофных организмов к неблагоприятным абиотическим факторам на примере цист Artemia salina

Проведен системный анализ и представлено комплексное исследование механизмов устойчивости диапаузирующих цист *A salina* к различным неблагоприятным воздействиям – резким колебаниям температур и действию корпускулярных (нейтронных) потоков с различной интенсивностью. С помощью метода ядерного магнитного резонанса было показано, что движение фракции протонов в цистах *A salina* составляет 3 – 4% (от веса образца) и принадлежит липидной и водной фракциям, и эта подвижность одинакова как в опытных, так и в контрольных образцах. Выявленную способность цист *A salina* охлаждаться при нагревании, можно отнести к защитно-приспособительным механизмам устойчивости при неблагоприятных воздействиях. Способность цист, находящихся в неблагоприятных условиях низких температур и интенсивного корпускулярного (нейтронного) потока, сохранять концентрацию свободных радикалов в пределах физиологических значений свидетельствует о наличии в них системы антиоксидантной защиты. Показано, что облучение цист *A salina* корпускулярным (нейтронным) потоком, вызывает биологический ответ в мертвых цистах *A salina*, то есть внутренняя протонная подвижность в мертвых образцах цист увеличивается.

Yuliana G Nikolaeva, (Russia)

Studying of mechanisms of stability heterotropheous organisms to adverse to abiotic factors on example cysts Artemia salina

System analysis of mechanisms of stability diapause cysts *A salina* to various adverse influences is submitted to sharp fluctuations of temperatures and action of corpuscular (neutron) fluxes with various intensity. With method of nuclear magnetic resonance it has been shown, that movement of fraction protons in cysts *A salina* is 3 - 4% (of dry sample) lipids and water fractions. This mobility is identical both in test, and in samples control samples. The revealed ability of cysts *A salina* during heating, it is possible relate to protective adaptive mechanisms cooling of stability at adverse effects. The ability of cysts to sustain the constant free radical concentrators (in the physiological intervals) during intensive corpuscular (neutrons) radiation and low temperature conditions argues about the presence in them systems antioxidant protection. The irradiation cysts *A salina* is shown by a corpuscular (neutron) flux, that, causes the biological answer in dead cysts *A salina*, that is internal proton mobility in dead samples cysts increases.

Подписано в печать 13 05 2008 г

Печать на ризографе Тираж 100 экз Заказ № 1058. Объем 1,3 п л.
Отпечатано в типографии ООО "Алфавит 2000", ИНН 7718532212,
г Москва, ул Маросейка, д 6/8, стр 1, т 623-08-10, www.alfavit2000.ru