

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

ЛИ Наталья Геннадьевна

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ НАСЕКОМЫХ К
ХОЛОДНОМУ И СУХОМУ КЛИМАТУ ЯКУТИИ**

03.03.01 – физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Казань-2014

Работа выполнена на базе лаборатории систематики и экологии беспозвоночных Учреждения Российской академии наук Института биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения РАН (г. Якутск), лаборатории генетических исследований Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова НИИ Здоровья (г. Якутск) и лаборатории экофизиологии и токсикологии Норвежского университета наук и технологий (г. Трондхейм).

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии КФУ

Мукминов Малик Нилович

доктор биологических наук, профессор кафедры гидробиологии и зоологии беспозвоночных Иркутского государственного университета (ИГУ), директор НИИ биологии ИГУ

Тимофеев Максим Анатольевич

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии медицинского факультета РУДН

Торшин Владимир Иванович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Защита состоится 29 апреля 2014 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.28 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Левобулачная, д. 44. Телефон: 7(843)29-29-266

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» www.ksu.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.м.н., профессор

Зефирова Т.Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Температура и влажность являются наиболее изменчивыми факторами окружающей среды, в наибольшей степени, влияющими на распределение живых организмов. У насекомых, являющихся пойкилотермными организмами, гомеостаз внутренней среды при постоянно меняющихся условиях их обитания поддерживается посредством эволюционно закрепившихся поведенческих и физиологических адаптаций. В основе температурных адаптаций, позволяющих насекомым освоить практически любую территорию, лежат физиологические стратегии. Биохимическую основу этих стратегий составляют химические соединения, функциональная активность которых определяет величину адаптационного потенциала.

Существенный прогресс в формировании современных представлений о механизмах холодоустойчивости насекомых достигнут на основе интеграционных исследований в области физиологии, биохимии, биофизики, молекулярной биологии (Margesin, 1999). Важным достижением этих исследований явилось создание фундаментальных основ низкотемпературной физиологии насекомых. Прежде всего, были сформулированы принципы двух основных физиологических стратегий холодоустойчивости. Одна из них (стратегия морозоизбегания, freeze-avoiding или морозочувствительности) связана с удалением из организма всех частиц, способных инициировать образование льда, а также с продукцией антифризных белков и мультимолярных концентраций полиолов (Zachariassen, 1985; Duman et al., 1991). Насекомые, использующие данную стратегию, погибают, если лед образуется во внеклеточной среде. В соответствии с другой стратегией (стратегия морозотолерантности, freeze-tolerance или морозоустойчивости), насекомые продуцируют высокомолекулярные белки, инициирующие контролируемое лед-образование в гемолимфе в области субнулевых температур (-7...-12⁰C), при этом они не погибают. Полиолы также играют значительную роль в холодовой резистентности этой группы насекомых, выполняя функцию криопротекторов (Duman, 1991; Delinger et al., 1998; Ли, 2011).

Проблема преимущества той или иной стратегии холодовой адаптации для насекомых, обитающих в различных климатических зонах, представляет интерес для понимания экологии и эволюции холодоустойчивых организмов.

Известно, что в регионах с мягким и влажным климатом (например, Дании) обитает много морозочувствительных насекомых. В местах с экстремально холодным климатом (континентальная Аляска, Канада, Якутия) наблюдается преобладание морозоустойчивых насекомых (Ring, 1985; Miller, 1985; Sinclair, 2003; Li & Averensky, 2007). Несмотря на то, что за последние десятилетия получена обширная информация о холодоустойчивости насекомых из разных климатических зон, существует дефицит такой информации по экстремально холодным территориям планеты (Берман и др., 2007).

Холодные континентальные области характеризуются не только низкими зимними температурами, но и низкой влажностью воздуха, как в зимний, так и летний периоды. Поэтому в процессе эволюции, у насекомых, обитающих в таких условиях, развились механизмы, направленные на поддержание водного баланса, который, как известно, во многом зависит от особенностей строения кутикулы насекомых, поведенческих приспособлений, в зимнее время - от типа стратегии холодовой адаптации (Ушатинская, 1957; Lundheim & Zachariassen, 1993). Исследования взаимосвязи водного баланса и устойчивости насекомых к низкой влажности воздуха на фоне экстремальных температур окружающей среды в зимний и летний периоды в настоящее время находятся на стадии становления.

Практическая значимость данных исследований заключается в том, что насекомые, адаптированные к экстремальным условиям обитания, являются миниатюрной моделью для изучения сложных процессов реактивации жизни после низкотемпературного стресса, которому они подвергаются в природе. Изучение молекулярных процессов, лежащих в основе этого уникального явления, представляет теоретический и прикладной интерес для современной криобиологии. В этом аспекте, детальное изучение существующих в природе физиологических и молекулярных механизмов толерантности к воздействию низких температур, является весьма актуальным.

Цель исследований

Основная цель - изучение физиологических механизмов адаптации насекомых к холодному и сухому климату Якутии. При этом основной задачей является исследование общих принципов холодоустойчивости и водного баланса насекомых сквозь призму специфических климатических условий Якутии.

Задачи исследования

1. Определить типы стратегий холодовой адаптации насекомых к низким температурам, преобладающим в зимний период в Центральной Якутии, являющейся одним из самых холодных среди обитаемых регионов планеты
2. Исследовать физиологические механизмы устойчивости отдельных видов насекомых к пролонгированному воздействию низких и ультранизких температур
3. На примере нескольких видов насекомых изучить особенности водного баланса насекомых в условиях сухого воздуха в зимний и летний периоды в Центральной Якутии
4. Оценить возможность использования криопротекторных соединений, вырабатываемых холодоустойчивыми насекомыми для криоконсервирования клеток крови человека.

Защищаемые положения

1. В условиях сурового климата Якутии, характеризующегося не только низким абсолютным температурным минимумом ($-64,5^{\circ}\text{C}$), но и длительным периодом температур в области $-45\dots-55^{\circ}\text{C}$, эволюция холодоустойчивости насекомых происходит, главным образом, в направлении распространения видов, способных развивать устойчивость к замерзанию. Стратегия морозочувствительности может быть распространена в значительно меньшей степени в исследованном регионе.
2. Стратегия морозоустойчивости имеет ряд существенных преимуществ по сравнению со стратегией чувствительности к замерзанию. Одно из таких преимуществ заключается в более сильном криопротекторном эффекте полиолов у морозоустойчивых насекомых.
3. Причина более значительного холодоустойчивого эффекта полиолов, в частности, глицерина у морозоустойчивых насекомых ассоциируется с их участием в формировании крупных агрегатов, состоящих из лед-нуклеирующих полипептидов, инициирующих процесс лед-нуклеации в области субнулевых температур. Такие лед-нуклеирующие структуры обеспечивают высокую вероятность лед-нуклеации в целом и, как следствие, высокую холодоустойчивость этих видов.

4. Водный баланс связан с типом стратегии холодовой адаптации. У морозочувствительных насекомых в зимнее время существует проблема сохранения воды в условиях, когда фазовое давление внутри организма выше, чем во внешней среде. По этой причине в эволюционной истории таких насекомых кутикула с очень низкой проницаемостью для воды – очень важное приобретение. У морозоустойчивых насекомых благодаря процессу лед-нуклеации в зимний период вода находится в лед-ообразной, т.е. консервированной форме. Поэтому для них в меньшей степени опасны потери воды через наружные покровы. Однако, морозоустойчивые виды, испытывающие водный дефицит не только в зимний, но и в летний период, в процессе эволюции развили покровы, структура которых также эффективно препятствует чрезмерному испарению воды.

Научная новизна и теоретическая значимость

В настоящей работе впервые приведены результаты исследований типов стратегий холодовых адаптаций для 29 видов насекомых Якутии, принадлежащих к трем таксономическим группам: Coleoptera, Diptera, и Lepidoptera. Показано, что в условиях экстремально холодного климата с длительными периодами очень низких температур ($-47\dots-55^{\circ}\text{C}$) и среднегодовой температурой около -11°C (Гаврилова, 2003), стратегия морозоустойчивости является доминирующей среди изученных насекомых. Как показал анализ 29 видов насекомых, обитающих в Центральной Якутии, 93,3% из изученных видов были морозоустойчивыми и только 6,7% являлись морозочувствительными.

Одна из причин преобладания данной стратегии заключается в более сильном криопротекторном эффекте полиолов у морозоустойчивых видов, чем у морозочувствительных насекомых.

Другая причина, по нашему предположению, связана с заменой стратегии морозочувствительности на стратегию устойчивости к замерзанию, которая произошла в процессе эволюционного развития этих насекомых. Так, на трех видах насекомых, обитающих в Центральной Якутии, *Cossus cossus*, *Acanthocinus aedilis*, *Pieris rapae*, установлен факт смены стратегии адаптации в зависимости от климатических условий обитания. На примере *A. aedilis* показана возможность комбинирования устойчивости к замерзанию и способности к переохлаждению, а также изменение филогенетически обусловленного признака (избегание замерзания), который в целом характерен

для жуков семейства Cerambycidae. Такая комбинация привела, в конечном итоге, к высокой резистентности данного вида к низким температурам (ниже -37°C).

Показано, что *Rhagium inquisitor*, принадлежащий к морозочувствительным видам Якутии, избегает замерзания благодаря фенотипическим и физиологическим модификациям, повышающим его выживаемость в столь суровых климатических условиях.

Впервые на примере жука *Upis ceramboides* изучены сезонные изменения физико-химических свойств гемолимфы, отражающие характер адаптационных процессов на физиологическом уровне, которые позволяют данному виду выдерживать длительный период экстремально низких зимних температур в Центральной Якутии.

В модельных экспериментах по тепловой акклимации морозоустойчивых гусениц боярышницы *A. crataegi* впервые выявлена взаимосвязь между специфической активностью лед-нуклеирующих белков, концентрацией глицерина и общей концентрации белков в гемолимфе с одной стороны, и степенью холодоустойчивости этих гусениц - с другой. Показано, что уменьшение концентрации глицерина и белка в гемолимфе, происходящее в процессе акклимации этих насекомых при комнатной температуре, вызывает качественное изменение структуры лед-нуклеирующих белков, что, в конечном итоге, приводит к драматическому падению потенциала холодоустойчивости этих насекомых. Результаты этих исследований указывают на то, что глицерин участвует в формировании и, возможно, стабилизации лед-нуклеирующих полипептидов, ответственных за высоковероятный процесс лед-нуклеации в области субнулевых температур. Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на криопротекторную функцию глицерина у морозоустойчивых насекомых и по сообщению новостного издания Life Sciences weekly полученные факты представляют собой инновационный тренд в Российской Федерации в области изучения этой группы химических соединений (*Life Science Weekly, June 5, 2012, page 2639*).

На восьми видах показано, что в качестве низкомолекулярного криопротектора насекомые продуцируют именно глицерин.

Исследование взаимосвязи между типом стратегии адаптации к холоду и устойчивостью к низкой влажности воздуха, проведенное на нескольких видах Центральной Якутии, позволяет высказать предположение о том, что жуки с

высокой кутикулярной проницаемостью развили в процессе эволюции способность инициировать замерзание в области субнулевых температур, что позволяет им избегать значительных потерь воды в организме. Однако, в летний период в Якутии, насекомые, также подвергаются влиянию очень сухого воздуха и, вероятно, поэтому некоторые из них (*A. crataegi* и *A. aedilis*) развили кутикулу с низкой транскутикулярной проницаемостью для воды.

Теоретическое значение данных исследований заключается в том, что они вносят существенный вклад в понимание эволюции холодоустойчивости в экстремально холодных регионах Земли.

Методическая новизна

Впервые предложен метод, позволяющий оценить устойчивость насекомых к низким и ультранизким температурам на основе измерения концентрации глицерина, общей концентрации белков, а также специфической лед-нуклеирующей активности в гемолимфе тестируемых насекомых.

Впервые разработан метод использования криопротекторных соединений, продуцируемых холодоустойчивыми насекомыми в криоконсервировании лимфоцитов крови человека.

Для изучения адаптационных процессов у насекомых Якутии в условиях экстремального климата внедрены классические физиологические методы исследований, разработанные в Норвежском университете наук и технологий (г. Трондхейм).

Практическая значимость работы

В данном исследовании впервые показано, что экстракт зимних гусениц *A. crataegi* (в концентрации от 5 до 16%), в состав которого входят три основных компонента, глицерин (45,5%), каротин (2,4%) и соединение пептидной природы (39,6%), оказывает криопротекторный эффект при замораживании лимфоцитов крови человека до -25°C . Максимальная эффективность была получена при использовании экстракта в концентрации 16%. При этом его эффективность превышала в 3 раза эффективность глицерина, взятого в эквивалентной концентрации. Помимо этого, экстракт проявлял выраженный стабилизирующий эффект при многократных циклах замораживания - оттаивания лимфоцитов.

Результаты данных исследований могут быть использованы как в лабораторной практике, так и в качестве учебного материала для спецкурсов по криобиологии в ВУЗах.

Личный вклад соискателя

Диссертационная работа является итогом 14-летней работы автора. Исследования были проведены на базе 4-х научно-исследовательских учреждений: Северо-Восточного Федерального Университета им. М.К. Аммосова (СВФУ, кафедра биохимии), г. Якутск; Института биологических проблем криолитозоны СО РАН (лаборатория систематики и экологии беспозвоночных), г. Якутск; СВФУ им М.К. Аммосова НИИ Института здоровья (лаборатория генетических исследований), г. Якутск; Норвежского Университета Наук и Технологий (лаборатория экофизиологии и токсикологии), г. Трондхейм, Норвегия. За этот период автором лично была разработана методика изучения криопротекторных соединений, продуцируемых холодоустойчивыми насекомыми, а также предложен новый метод, позволяющий оценить степень устойчивости насекомых к низким и ультранизким температурам. Внедрены классические методы исследования физиологии холодоустойчивости насекомых, освоенных в Норвежском университете наук и технологий, в рамках многолетнего международного сотрудничества с этим университетом, организовано несколько научных экспедиций на территории Якутии. В сотрудничестве с СВФУ НИИ Институту здоровья автором была создана инфраструктура для проведения аналитических работ. Научные эксперименты, обработка результатов и написание научных статей было сделано лично автором и в соавторстве.

Апробация работы

Результаты исследований были доложены на научных семинарах и конференциях, проводимых в СВФУ им. Аммосова и ИБПК СО РАН, Всероссийских конференциях «Аналитика Сибири и Дальнего Востока», 2000, 2004, Новосибирск; XXII Всероссийской конференции по спектроскопическим методам, Звенигород, 2001; IV Европейском симпозиуме по экофизиологии беспозвоночных, Санкт - Петербург, 2001; Международном симпозиуме по аналитическим наукам, Москва, ICAS-2006; Международной школе- семинаре по холодоустойчивости насекомых, Орхус, Дания, 2005; Международной конференции по экспериментальной биологии, Глазго, Шотландия, 2007; Международной конференции по криобиологии, Саппоро, Япония, 2009;

Бизнес-совещании в Корейском Институте Полярных Исследований, KOPRI, 2010; Международной конференции по изучению адаптаций эктотермных организмов к факторам окружающей среды (ISEPER4), Ренн, Франция, 2011; международной конференции по криобиологии, Харьков, Украина, 2012; юбилейной конференции ИБПК СО РАН, г. Якутск, 2012; Международной конференции по изучению адаптаций эктотермных организмов к факторам окружающей среды (ISEPER5), Лондон, Канада, 2013 г; Втором международном симпозиуме по энтомологии (GCE-2013), г. Кучинг, Малайзия, 2013.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 45 работ, из которых двадцать четыре статьи в реферируемых журналах и 1 патент Российской Федерации.

Гранты

Данные исследования были поддержаны следующими научными фондами:

Университеты России – фундаментальные исследования, проект 2432, 1998-2000

Норвежский научно-исследовательский фонд, проект 1167106/V 40, 2005-2007

РФФИ, Арктика, проект 06-04-96048, 2006-2008

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений. Диссертация изложена на 245 стр. печатного текста (включая приложения), иллюстрирована 42 рис. и содержит 15 таблиц и 3 схемы. Список использованной литературы включает 240 публикаций, подавляющее большинство которых принадлежит зарубежным авторам.

Благодарности

Данные исследования были начаты в период моей работы на кафедре биохимии биолого-географического факультета СВФУ им. Аммосова. Я выражаю свою благодарность зав. кафедры профессору, д.б.н. Б.М. Кершенгольцу за активное содействие моему профессиональному росту и предоставление возможности выполнять высококвалифицированную работу на кафедре и факультете.

Я бы хотела выразить свою благодарность за поддержку данных исследований администрации Института биологических проблем криолитозоны СО РАН : д.с-х.н. Б. И.

Иванову, к.б.н. П.А. Ремигайло, профессору, д.б.н. Б.М. Кершенгольцу, д.б.н., Н.И. Гермогенову, д.б.н. В.Н. Винокурову. В НИИ здоровья СВФУ им. М.К. Аммосова я проводила экспериментальную работу, и я выражаю свою благодарность директору Института, профессору, д.м.н. В.Г. Кривошапкину. Особую признательность и благодарность я адресую зав. лаборатории генетических исследований НИИ здоровья СВФУ им. М.К. Аммосова к.б.н. В.Л. Осаковскому за идею развития исследований в области холодоустойчивости насекомых, предоставление возможности выполнять исследования на научной базе этой лаборатории, неустанную моральную поддержку и подвижничество. Считаю также приятным долгом выразить большую благодарность и признательность своим зарубежным коллегам, сотрудничество с которыми повысило качественный уровень данных исследований: академику Норвежской Академии наук, профессору К.Е. Захариассену (Норвегия), профессору М. Холмстрап (Дания), научным сотрудникам с PhD степенью - Э. Кристиансен, С. Педерсен С. (Норвегия), Б. Синклар (Канада).

Я бы также хотела поблагодарить своих коллег, сотрудничество с которыми сделало возможным получение интересных научных результатов: к.х.н., в.н.с. И.Н. Зуеву, к.б.н., доцента СВФУ им. М.К. Аммосова А.А. Алексеева, сотрудников ИБПК СО РАН Е.Л. Каймук, И.Н. Кормухину, а также студентов биолого-географического факультета СВФУ им. Аммосова, выполнявших курсовые и дипломные проекты под моим руководством. Помощь в квалифицированном сборе насекомых оказывали сотрудники лабораторий ИБПК СО РАН: А. Степанов, Н.К. Потапова, Ю.В. Ермакова, И. Чикидов, С. Ноговицина, и им я также выражаю свою признательность. Я также выражаю свою благодарность А.П. Ли, зав. отделением переливания крови Якутского Диагностического Центра, Л.А. Оловиной, зав. отделом экономики Департамента по науке в 2001 г. за их помощь и поддержку, а также Н.А. Одинцовой (Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДО РАН), д.б.н. профессору за оказанную помощь в подготовке автореферата.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Литературный обзор. Современное состояние проблемы.

В главе представлен обзор современной литературы, касающейся изучения эколого-физиологических факторов, влияющих на формирование холодоустойчивости насекомых. Приводится детальная характеристика типов стратегий холодовых адаптаций у насекомых, раскрываются физиологические механизмы, лежащие в основе этих стратегий, рассматриваются вопросы взаимосвязи между стратегиями холодовых адаптаций и механизмами поддержания водного баланса, а также дается описание природных криопротекторных систем, вырабатываемых холодоустойчивыми насекомыми. На основе представленного литературного обзора обсуждается проблема практического использования знаний в области криобиологии насекомых. В данной главе также приведены определения

основных терминов, применяемых в мировой литературе по холодоустойчивости насекомых.

Стратегия морозоустойчивости (freeze-tolerance) - в основе устойчивости насекомых к замерзанию лежит процесс контролируемого лед-образования в гемолимфе при участии лед-нуклеирующих белков. Данный процесс происходит при температурах выше температуры кристаллизации внутриклеточной воды, благодаря чему насекомые не погибают при замерзании.

Стратегия морозочувствительности (freeze-avoiding) - предотвращение кристаллизации воды в организме путем его значительного переохлаждения. При этом из организма удаляются нуклеирующие агенты, способные вызвать спонтанное лед-образование, аккумулируются значительные концентрации полиолов, главным образом, глицерин, что понижает температуру замерзания, а также продуцируются антифризные белки, стабилизирующие переохлажденное состояние.

Температура переохлаждения (supercooling point) - температура, при которой происходит кристаллизация воды

Лед-нуклеирующие белки (ice-nucleating proteins) – это вещества, инициирующие контролируемое лед-образование в гемолимфе насекомых до того, как лед мог бы образоваться во внутриклеточных компартментах.

Специфическая лед-нуклеирующая активность (specific ice-nucleating activity) – это величина «плато», область высоких концентраций лед-нуклеаторов в гемолимфе, в пределах которых лед-нуклеирующая активность меняется очень незначительно при разбавлении образца гемолимфы.

Антифризные белки (antifreeze proteins) - это вещества, ингибирующие рост кристаллов льда при температуре ниже точки плавления, при этом величина температуры плавления не меняется.

Глава 2. Материалы и методы

Исследованный материал

Исследования физиологических механизмов устойчивости насекомых к холодному и сухому климату Якутии были проведены на нескольких видах, собранных для этих целей в значительных количествах. К этим насекомым относятся: *Aporia crataegi* (гусеницы) - около 25 г.; *Upis ceramboides* (жуки и личинки) –около 300 особей; *Rhagium inquisitor* (жуки и личинки) - 115 особей; *Pieris rapae* (куколки) –36 особей; *Acanthocinus aedilis* (жуки и личинки) - 18 особей; *Pytho depressus* (жуки и личинки) – 41 особей; *Adelocera fasciata* (жуки) – 17 особей; *Cossus cossus* (личинки, весом более 3 г) – 3 особи; *Delia floralis*, *ripae* - 61 особей. В работе также были использованы следующие насекомые: *Dendrolimus superans sibiricus* (n=7); *Curtonotus torridus* Panzer (n=6); *Cicindela nitidatricolor* (n=4); *Pterostichus eximius* A.Mor (n=5); *Pterostichus magus* Mnnnh. (n=7); *Amara similata* Gyllenhal (n=7); *Carabus kruberi* Fischer-Waldheim (n=6);

Cicindela campestris L. (n=5); *Silpha carinata* Herbst (n=6); *Thanatophilus latecarinatus* Fabricius (n=7); *Monochamus sutor* (n=6); *Monochamus urussovi* (n=4); *Acanthocinus aedilis* (n= 15); *Hylobius albosparsus* (n=3); *Stenogostus undulates* (n=5); *Acanthocinus carinulatus* (n=5); *Stephanocleonus* Sp. (n=7) ; *Ips subelongatus* (n= 4); *Silpha carinata* (n= 6) ; *Thanatophilus latecarinatus* (n=7); *Lylophagus cinotus* (n= 5) ; *Xylophagus* Sp. (n= 8); *Laphria* Sp. (n= 7); *Dendrolimus superans sibiricus* (n= 5).

Исследование физико-химических свойств гемолимфы

Температуру переохлаждения насекомых в диапазоне 0°...-20°С измеряли с помощью термодпары, соединенной с самописцем. Температуру переохлаждения определяли по экзотермическому эффекту, сопровождающему переход гемолимфы насекомого из жидкого состояния в твердое. После оттаивания насекомых проверяли на их способность к координированному движению и дыханию при +20°С.

Осмоляльность гемолимфы насекомых определяли по значению температуры плавления с помощью Clifton нанолитр осмометр, позволяющего производить измерения на 20nL образца гемолимфы, который наносили на поверхность пор измерительной ячейки, предварительно загруженных минеральным маслом. Ячейку охлаждали до момента замерзания образца, после чего его медленно отогревали. Температура, при которой последний самый маленький кристалл исчезал, принималась за температуру плавления.

Для определения лед-нуклеирующей активности гемолимфу зимних насекомых объемом 0,25 мкл вводили с помощью специального микрошприца в 5мкл раствора NaCl внутрь капилляра. При этом в эксперименте использовали следующие концентрации NaCl, выраженные в единицах осмоляльности: 0.509 mOsm , 0.998 mOsm, 1.500 mOsm, 1.991 mOsm. Полученный образец медленно охлаждали со скоростью 1°С/мин до тех пор, пока тепло, высвобождаемое при кристаллизации растворов, не было зарегистрировано в виде температуры замерзания образцов.

Содержание глицерина в гемолимфе насекомых определяли энзиматическим методом с помощью набора реактивов Sigma (Product code F 6428) по методике, описанной в инструкции к данному набору.

Изучение водного баланса насекомых.

Чтобы определить относительное содержание воды, насекомых высушивали до постоянного веса при температуре +40°C. Эксперименты по изучению скорости потери веса в процессе дыхания насекомых проводили в закрытых бюксах, влажность в которых контролировали с помощью силикагеля. Потерю веса определяли путем взвешивания насекомых до начала эксперимента и после 3-5 часов их выдерживания в бюксе с силикагелем. Данные эксперименты проводили при +20°C. Скорость поглощения кислорода измеряли с помощью стеклянного респирометра при +20°C по известной методике (Грин и др., 1990).

*Методы исследования химического состава спиртового экстракта зимних гусениц боярышницы *Aporia crataegi* L.*

Навеску гусениц гомогенизировали в этиловом спирте в соотношении 1г:15 мл. Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 5000g. Супернатант концентрировали на лиофилизаторе и подсушивали в токе воздуха для удаления остатков спирта (до постоянного веса). 25 мкл полученного образца растворяли в 200 мкл 70%-ного этанола и использовали для проведения тонкослойной хроматографии (ТСХ) в системе ацетон: вода = 41:1, на силикагеле. В результате хроматографии образуются три фракции анализируемого вещества. В последующем каждую фракцию вырезали и элюировали в соответствующем растворителе: фракцию 1 - в 3N HCl, фракцию 2 - в 70%-ном этаноле, фракцию 3 - в ацетоне.

Наличие глицерина подтверждали методом ИК-спектроскопии (ИК-спектрофотометр PE 577, Perkin Elmer, США) с использованием KBr таблетки в области длин волн: 2000-400 см⁻¹. Этим же методом исследовали соединения углеводной, липидной и пептидной природы, содержащихся в спиртовом экстракте насекомых. В качестве маркеров использовали бурый жир суслика, глюкозу, чистый препарат пептидной фракции, выделенной из зимних гусениц *A. crataegi*. Спектры текучих соединений (глицерин, жиры) снимали с использованием специальной KBr-пластины.

Фракцию каротиноидов элюировали в ацетоне и исследовали методом UV-VIS спектрофотометрии (UV-VIS спектрофотометр, Beckman, DU Series 600, Швеция) в области длин волн 350-600 нм. Химическую природу пептидной фракции также исследовали спектрофотометрическим методом в области длин волн 190-400 нм. После элюции этой фракции в растворе 3N HCl,

элюат подсушивали на воздухе и таким образом получали кристаллическую форму данного вещества, которое исследовали в реакции с нингидрином. Содержание всех полученных компонентов определяли весовым методом.

Методы определения криопротекторной активности экстракта зимних гусениц боярышницы A. crataegi L.

Оценку криопротекторных свойств концентрированного экстракта зимних гусениц проводили в опытах по замораживанию лимфоцитов крови человека. Лимфоциты выделяли по известной методике (Кейтс, 1975). Пробы с лимфоцитами готовили в 5 стерильных криопробирках: одна – контрольная, без добавления криопротектора, четыре пробирки - с различными криопротекторами. В первые две пробирки с суспензией клеток добавляли глицерин так, чтобы его концентрация в пробирках была равна соответственно 5, 16%, в остальные две пробирки добавляли исследуемый экстракт в этих же концентрациях. При этом пробирки с аликвотами суспензий клеток находились на ледяной бане, криопротекторы добавляли постепенно при перемешивании. Подготовленные таким образом образцы переносили в холодильную камеру и инкубировали 10 мин при +4⁰С. Далее пробы замораживали в холодильной камере при -25⁰С в течение двух часов. По истечении данного времени пробы быстро оттаивали, поместив их в водяную баню при +37⁰С. При многократных циклах замораживания-оттаивания эту процедуру повторяли. Условия, время замораживания, а также процедура оттаивания лимфоцитов во всех случаях были одинаковыми. Для подсчета лимфоцитов их окрашивали красителем трипановым синим. Количество живых и мертвых клеток анализировали с помощью Т-теста.

Определение потенциала холодоустойчивости насекомых на примере A. crataegi L.

В январе листовые гнезда, содержащие гусениц, были перенесены с температурного режима -47⁰С на открытом воздухе в режим морозильной камеры с температурой -85⁰С для инкубации в течение требуемого времени (в зависимости от эксперимента). По истечении экспериментального времени инкубирования при этой ультранизкой температуре, гнезда были вновь перенесены на открытый воздух с температурой -45...-48⁰ на 1 час, затем помещены в морозильную камеру при -28⁰С на ночь. После этого они были перенесены в верхний отсек камеры с температурой +4...+5⁰С, где их выдерживали в течение трех часов. Перед экспериментом гусеницы были

протестированы на способность к активному движению при +22°C в течение 4 часов и дыханию при +20°C. В качестве критериев потенциала холодоустойчивости были выбраны условия, при которых за короткий промежуток времени можно было определить нижний порог холодоустойчивости насекомого. Более мягкий режим замораживания гусениц (скорость не более 1°C/мин) и выдерживание их при температуре -22°C был наиболее удобным методом тестирования холодоустойчивости данного вида, при этом время инкубации составляло 60 мин. В качестве второго критерия холодоустойчивости была принята толерантность насекомых к многократным циклам замораживания – оттаивания при температуре, эквивалентной их температуре переохлаждения. После каждого этапа замораживания, гусениц оттаивали при комнатной температуре. Только гусеницы, способные к активному движению, отбирали для следующего цикла замораживания - оттаивания.

Статистические методы

Сравнение средних значений между образцами было сделано с помощью программы ANOVA/ Tukey's с использованием статистического пакета Статистика 6.0. Величины представлены как среднее значение со стандартным отклонением.

Глава 3. Стратегии холодовых адаптаций у исследованных насекомых Якутии

В данной работе была определена стратегия холодовой адаптации для 29 видов насекомых, обитающих в Центральной Якутии на основе значений их температур переохлаждения, тестирования на выживаемость после размораживания, а также определения лед-нуклеирующей активности гемолимфы (Табл.1). В настоящем исследовании были использованы три различные по величине выборки насекомых, относящихся к отрядам Coleoptera, Diptera и Lepidoptera. В группу Coleoptera входил 21 вид из 7 семейств (Carabidae, Elateridae, Tenebrionidae, Cerambycidae, Curculinoidea, Pythidae, Silphidae). Только один вид, *Rhagium inquisitor*, относящийся к семейству Cerambycidae, являлся морозочувствительным в этой группе (Табл. 1). В отряде Diptera все четыре исследованных вида были морозоустойчивыми. В отряде Lepidoptera для одного вида, *Apalete psi*, значение температуры переохлаждения было взято из литературных источников (Hansen, 1978). Данный вид в соответствии с его температурой переохлаждения является морозочувствительным. Таким образом, анализ 29 видов насекомых показал,

что 93,3% из изученных видов являются морозоустойчивыми и только 6,7% - морозочувствительными. Выбор стратегии адаптации не зависел от способа зимовки. В большинстве случаев насекомые имели небольшую массу тела.

Среди изученных в данной работе насекомых единственный вид, жук *R. inquisitor*, был квалифицирован как морозочувствительный с температурой переохлаждения ниже -35°C , величиной термального гистерезиса, $6-8^{\circ}\text{C}$ и величиной осмоляльности гемолимфы до 4000 mOsmol (при этом концентрация глицерина была 2,41M). Для сравнения, для *R. inquisitor*, обитающего в Норвегии, характерны температура переохлаждения -27°C , гистерезисная активность $4-6^{\circ}\text{C}$ и осмоляльность гемолимфы около 1300 mOsmol (Zachariassen et al., 1982). В Якутии жуки *R. inquisitor* значительно меньше по размеру, имеют более темную окраску тела в сравнении со скандинавским аналогом. Они зимуют глубоко в корневой части деревьев под почвенным и снежным покровом, т.е. в хорошо забуференных местах.

Таблица 1. Температура переохлаждения, лед-нуклеирующая активность гемолимфы, масса тела, зимние укрытия и тип стратегии холодной адаптации некоторых насекомых Центральной Якутии, принадлежащих к различным таксономическим группам (Ли, 2012)

Насекомые	Температура переохлаждения, $^{\circ}\text{C}$		Зимние укрытия	Тип стратегии холодоустойчивости	Вес, г (среднее значение)
	Интактного насекомого	0,9% NaCl + гемолимфа*			
Coleoptera					
Carabidae <i>Curtonotus torridus</i> , имаго (n=6)	-6.0 ± 0.32	-5.9 ± 0.1	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.06
<i>Cicindela nitidatricolor</i> , имаго (n=5)	-7.5 ± 0.18	-7.3 ± 0.23	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.106
<i>Pterostichus eximius</i> , имаго (n=5)	-9.6 ± 1.1	-9.5 ± 0.91	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.075
<i>Pterostichus magus</i> , имаго (n=7)	-7.5 ± 1.4	-7.2 ± 0.85	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.038
<i>Amara similata</i> , имаго (n=7)	-7.0 ± 0.5	-6.9 ± 0.61	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.071
<i>Carabus kruberi</i> , имаго (n=6)	-7.25 ± 0.7	-7.0 ± 1.2	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.288
<i>Cicindela campestris</i> , имаго (n=5)	-10.0 ± 0.7	-9.5 ± 1.1	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.1
Elateridea <i>Adelocera fasciata</i> , adult, (n=10)	-6.5 ± 1.1	-6.3 ± 0.7	Под корой погибшей сосны, лиственницы,	МУ	0.104
<i>Stenogostus undulates</i> , adult, (n=5)	-8.8 ± 0.6	-8.6 ± 0.67	иногда выше снежного покрова	МУ	-

Cerambycidae <i>Monochamus sutor</i> , имаго (n= 6)	-3.0 ± 0.9	-3.0 ± 1.2	Под корой сосны, лиственницы, выше снежного покрова	МУ	0.251
<i>Monochamus urussovi</i> , имаго (n= 4)	-6.8 ± 1.5	-6.7 ± 0.45		МУ	0.139
<i>Rhagium inquisitor</i> , имаго (n= 10)	-33.0 ± 2.1	-	Под корой пней от срубленных деревьев	МЧ	0.044
<i>Acanthocinus aedilis</i> , имаго (n= 12)	-25.0 ± 1,2	-	Под корой погибшей сосны, выше снежного покрова	МУ	0.319
<i>Acanthocinus carinulatus</i> , имаго (n=4)	-11,1 ± 2,1	-10 ± 0.24		МУ	0,455
Tenebrionidae <i>Upis ceramboides</i> , имаго (n=12)	-7.5 ± 2.6	-7.3 ± 0.28	Под корой березы, иногда выше снежного покрова	МУ	0.206
Curculinoidea <i>Stephanocleonus</i> Sp., личинки (n=7)	-8.75 ± 0,9	-8.55 ± 0.78	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	0.038
<i>Hylobius albosparsus</i> , имаго (n= 5)	-8.5 ± 1,2	-8,35 ± 1,5	Почвенная подстилка, под снегом	МУ	-
<i>Ips subelongatus</i> , имаго (n= 4)	-9.9 ± 0,7	-9.7 ± 0.45	Под корой лиственницы, иногда выше снежного покрова	МУ	-
Pythidae <i>Pytho depressus</i> , личинки (n=12)	-5.0 ± 1.3	-5.0 ± 0.67	Под корой сосны, выше снежного покрова	МУ	0.022
Silphidae <i>Silpha carinata</i> , имаго (n= 6)	-8.0 ± 1,3	-7.8 ± 0.89	В толще растительного дебриса, под снегом	МУ	0.120
<i>Thanatophilus latecarinatus</i> , имаго (n=7)	-7.5 ± 1.4	-7.3 ± 1.2	В толще растительного дебриса, под снегом	МУ	0.06
Diptera					
Xylophagidae <i>Lylophagus cinotus</i> , личинки, (n= 5)	-4.5 ± 1.7	-4.4 ± 0.9	Под корой сосны, выше снега	МУ	0.061
<i>Delia floralis</i> , пупарии (n=15)	-5.8 ± 0,8	-5.5 ± 0.71	В почве, под снегом	МУ	0.040
<i>Xylophagus</i> sp., личинки (n= 8)	-4.4 ± 1,3	-4.3 ± 0.56	-	МУ	-
Asilidae <i>Laphria</i> sp., личинки (n= 7)	-4.5 ± 1,2	-4.4 ± 1.3	-	МУ	-
Lepidopteran					
Pieridae <i>Aporia crataegi</i> , личинки (n= 15)	-11.5 ± 1.2	-10.5 ± 0.78	Листовые гнезда, выше снега	МУ	0.0083
<i>Pieris rapae</i> , пупарии (n= 12)	-8.5 ± 1.6	-8.3 ± 1.1	В почве, под снегом	МУ	0,150
Cossidae <i>Cossus cossus</i> , личинки (n= 3)	-5.05 ± 0,25	-5.0 ± 0.56	В почве, под снегом	МУ	3.916
Lasiocampidae <i>Dendrolimus superans sibiricus</i> , личинки (n= 5)	-11.6 ± 0.7	-10.7 ± 0.65	-	МУ	0.167
Noctuidae* <i>Apaete psi</i> , куколка	-37.8	-	-	МЧ	-

*0,9% р аствор NaCl имеет температуру замерзания -18⁰С

**Hansen, 1978

МУ – морозостойчивый

МЧ – морозочувствительный

Таким образом, сохраняя способность к переохлаждению *R. inquisitor* приспособился к столь суровым климатическим условиям благодаря модификации фенотипических и физиологических характеристик. Хотя численность *R. inquisitor* заметно меньше в Центральной Якутии по сравнению с численностью этих жуков в Скандинавии, данный вид является древним и устойчивым элементом Сибирской экосистемы. Большинство морозоустойчивых насекомых, зимующих в хорошо защищенных местах (почвенная подстилка), характеризуются довольно высоким значением температуры переохлаждения, что, вероятно, связано с наличием активных лед-нуклеаторов. Три вида, *Cossus cossus*, *Pieris rapae* и *Acanthocinus aedilis*, адаптировались к климатическим условиям Якутии путем смены стратегии адаптации. По литературным данным известно, что в Северной Европе эти виды развивают стратегию морозочувствительности (Somme, 1982), в то время как в Центральной Якутии они адаптируются к экстремальному холоду за счет стратегии устойчивости к замерзанию (табл. 2). Жуки *A.aedilis* характеризуются высокой степенью холодоустойчивости, в основе которой лежит комбинирование толерантности к замерзанию и способности к переохлаждению до -25°C . Это позволяет данному виду быть устойчивым к температурам ниже -37°C . Подобные фенотипы встречается также и в Канаде,

Таблица 2. Данные сравнительного анализа стратегии адаптации трех видов, обитающих в Центральной Якутии и странах Северной Европы (Ли & Осаковский, 2008)

Вид насекомого	Температура переохлаждения, °C		Наличие глицерина		Стратегия адаптации	
	Якутия	Север. Европа*	Якутия	Север. Европа*	Якутия	Северная Европа*
<i>Cossus cossus</i> (n=3)	-5.05 ± 0.25	-17.7	+	-	МУ	МЧ
<i>Acanthocinus aedilis</i> (n=6)	-10... -25.0	-25...-30.0	+	-	МУ	МЧ
<i>Pieris rapae</i> (n=5)	-8.5 ± 0.51	-25.8	+	-	МУ	МЧ

* Somme, 1982 МУ – морозоустойчивые МЧ -морозочувствительные

где описано несколько морозоустойчивых видов со способностью к глубокому переохлаждению (Ring, 1982). Установленный факт смены стратегий

демонстрирует очевидное предпочтение морозоустойчивости перед морозочувствительностью, когда насекомые обитают в холодных областях. Механизм переключения стратегий в данном случае расширяет возможности для более обширного распространения видов и обеспечивает их способностью выживать при низких температурах.

Глава 4. Физиологические особенности стратегии морозоустойчивости в регионах экстремально холодного климата на примере насекомых Якутии

Большинство исследованных насекомых имеют очень ограниченную способность к переохлаждению (Табл. 1). Как было показано рядом авторов, эта особенность обусловлена присутствием лед-нуклеирующих агентов в гемолимфе насекомых (Zachariassen, 1976; Duman et al., 1978; Somme, 1978). В данной работе лед-нуклеаторы белковой природы были впервые обнаружены в гемолимфе *U. ceramboides*, *A. crataegi*, *Adelocera fasciata* (табл. 3). На примере морозоустойчивого жука *U. ceramboides* показано, что лед-нуклеирующая активность гемолимфы насекомых подвергается сезонным изменениям: в соответствии с температурой переохлаждения, весной эта активность выше, чем в зимний период (Рис. 1). Однако изучение специфической лед-нуклеирующей активности гемолимфы по сезонам показало, что в зимний период лед-нуклеация является более вероятным событием, чем весной.

Таблица 3. Лед-нуклеирующая активность гемолимфы некоторых видов насекомых Якутии (Ли & Аверенский, 2007)

Вид насекомого	Температура переохлаждения, °С	
	Интактное насекомое	0,9% NaCl + гемолимфа
<i>Adelocera fasciata</i> (n=3)	-7.5 ± 0.10	- 7.77 ± 0.22
<i>Aporia crataegi</i> (n=4)	-12.6 ± 0.22	-12.0 ± 0.5
<i>Upis ceramboides</i> (n=4)	-9.7 ± 0.35	-9.5 ± 0.32

На эту особенность указывает исчезновение плато в профиле нуклеационной активности весенней гемолимфы в сравнении с зимним образцом (Рис. 2). Как видно, на рис. 2, физиологические изменения, происходящие в гемолимфе в

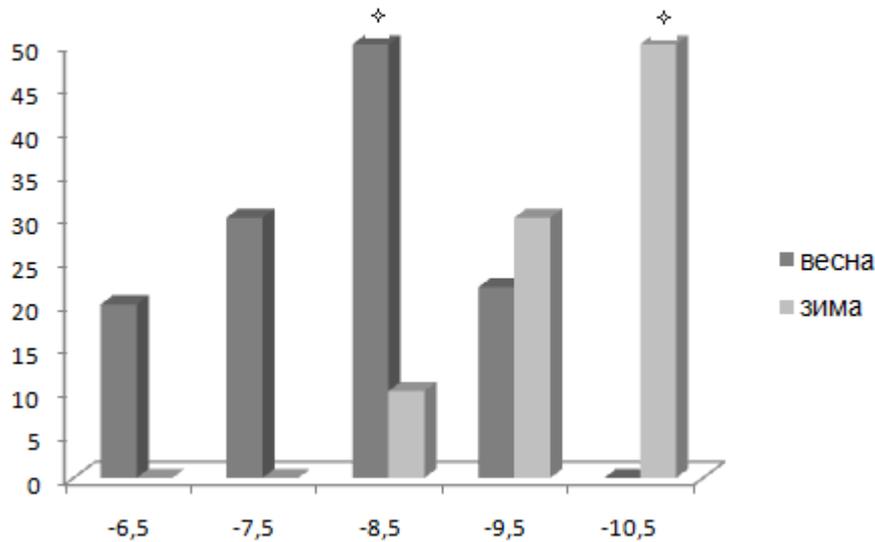


Рис. 1. Сезонные изменения лед-нуклеирующей активности (выражена как температура переохлаждения) гемолимфы *U. ceramboides* (статистически значимые различия между зимним и весенним максимумами температур переохлаждения, $p < 0.001$) (Ли, 2011).

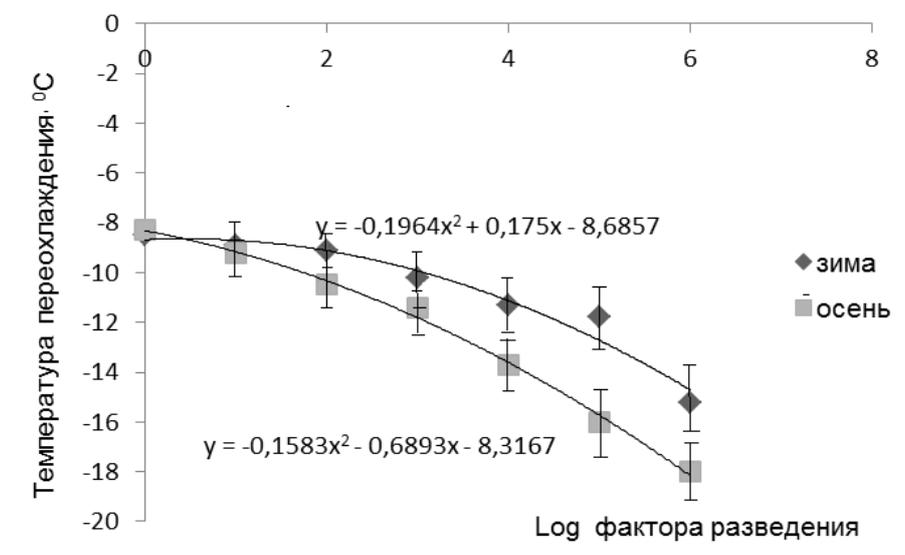


Рис. 2. Специфическая лед-нуклеирующая активность зимних и осенних образцов гемолимфы *U. ceramboides*, разбавленной повторно фактором 10 (представлена как функция фактора разбавления) (Ли, 2011)

период подготовки насекомых к диапаузе осенью, по-видимому, способствуют формированию нуклеационного потенциала “зимнего” типа.

Несмотря на существенные изменения физико-химических свойств гемолимфы *U. ceramboides* в весенний и осенний периоды в сравнении с зимним периодом, жуки являются морозостойчивыми и в эти сезоны, однако потенциал их

холодоустойчивости подвергается значительным изменениям. Если в зимний период *U. ceramboides* толерантен к температурам ниже -83°C , то в летний период, жуки чувствительны к замерзанию и, как показали настоящие исследования, это связано с существенным понижением как концентрации лед-нуклеирующих белков, до следовых количеств, так и общей концентрации белка, а также снижением осмоляльности гемолимфы (табл. 4).

Таблица 4. Изменение физиологических параметров гемолимфы *U. ceramboides* по сезонам (Ли, 2011)

Сезон	Температура переохлаждения, $^{\circ}\text{C}$	Осмоляльность, mOsmol	Концентрация белка, мг/мл
Зима (n=8)	$-10,5 \pm 1,2$	550 ± 25	117 ± 19
Весна (n=6)	$-8,5 \pm 0,8$	310 ± 18	106 ± 11
Лето (n=10)	$-7,7 \pm 0,2$	150 ± 14	45 ± 26
Осень (n= 7)	$-7,8 \pm 0,15$	432 ± 10	$56,8 \pm 15$

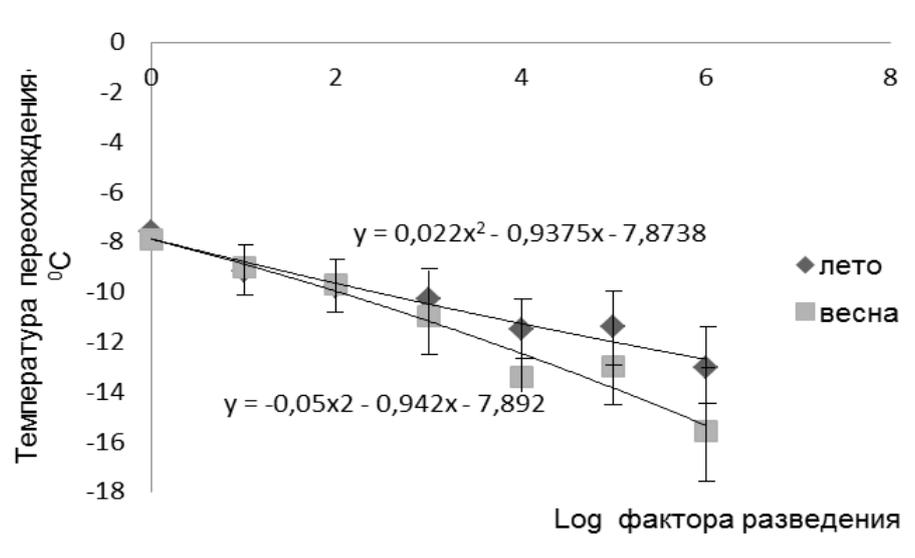


Рис. 3. Специфическая лед-нуклеирующая активность летних и весенних образцов гемолимфы *U. ceramboides*, разбавленной повторно фактором 10 (Ли, 2011)

Таким образом, специфическая лед-нуклеирующая активность гемолимфы жуков зависит от сезонных изменений физико-химических свойств, происходящих в гемолимфе, которые отображены в таблице 4. В летний

период характер кривой, отражающий лед-нуклеирующую активность, не подчиняется общей закономерности, что указывает на преобладание неспецифического нуклеационного механизма (Рис. 3). В связи с этим, температура переохлаждения не является точным параметром, оценивающим адаптивное значение процесса лед-нуклеации.

Для боярышницы *A. crataegi* характерна высокая резистентность к низким температурам. В зимний период в гемолимфе гусениц содержатся высокоэффективные лед-нуклеаторы и глицерин в концентрации, достигающей 1,18 М (Рис. 4,5).

Помимо этого, насекомые устойчивы к такой низкой температуре, как -85°C и многократным циклам замораживания-оттаивания.

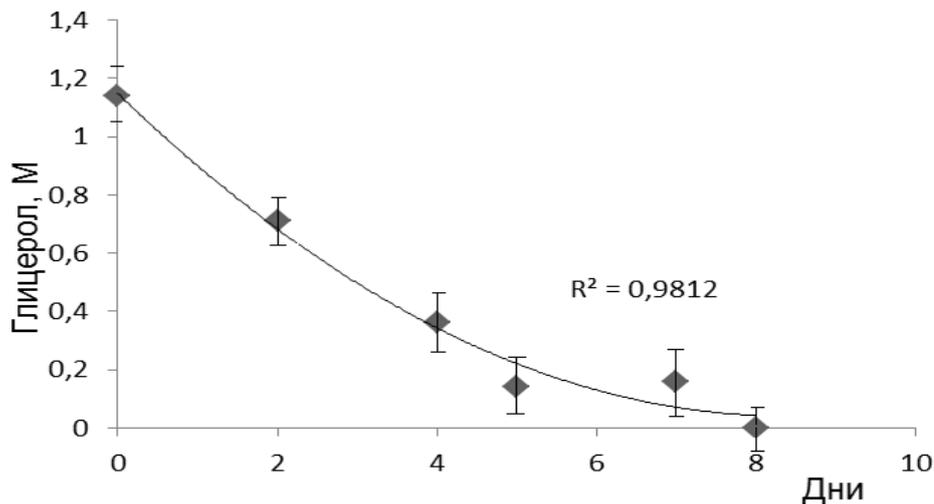


Рис. 4. Уровень глицерина в гемолимфе *A. crataegi* в процессе лабораторной акклимации (каждая точка представляет собой среднее значение 20 измерений)(Ли, 2012)

В модельных экспериментах по тепловой акклимации этих насекомых была впервые выявлена взаимосвязь между концентрацией глицерина в гемолимфе и ее специфической лед-нуклеирующей активностью (Li, 2011). Как видно на рис. 5, даже небольшие изменения в концентрации глицерина в гемолимфе приводят к изменению специфической лед-нуклеирующей активности. С течением времени акклимации, концентрация глицерина понижается до критических значений, что приводит к трансформации специфической лед-нуклеации в ее неспецифическую форму, не имеющего адаптационного значения для насекомых. Таким образом, глицерин, по-

видимому, участвует в формировании определенной структуры лед-нуклеаторов, которые в зависимости от концентрации этого полиола могут находиться в агрегированной либо дезагрегированной форме. Как видно из рис. 6, изменения в физико-химической ситуации в гемолимфе коррелируют с повышением температуры переохлаждения на пятый день акклимации. Последующее повышение температуры переохлаждения, вероятно, связано с дегидратацией гусениц, т.к. они находились без питания в течение всего времени эксперимента. Ранее мною было показано, что уменьшение содержания воды в теле гусениц с 72% до 30% вызывает понижение температуры переохлаждения с -11°C до $-13,5^{\circ}\text{C}$ (неопубликованные данные).

Хотя в результате лабораторной акклимации происходит повышение температуры переохлаждения, лед-нуклеация при этой температуре является неспецифической и не имеет адаптивного значения. Следовательно, акклимация сопровождается потерей адаптивных лед-нуклеаторов, что приводит к драматическому падению холодоустойчивого потенциала гусениц. Эти результаты также указывают на то, что температура переохлаждения сама по себе не отражает характера лед-нуклеирующего процесса у насекомых. Только, исходя из профиля лед-нуклеирующей активности, можно определить, является ли лед-нуклеация в гемолимфе насекомых чертой адаптационного процесса.

Таким образом, выявленный в ранних исследованиях факт более сильного криопротекторного эффекта полиолов у морозоустойчивых насекомых в сравнении с морозочувствительными видами (Zachariassen, 1985) нашел свое объяснение в исследовании механизма холодоустойчивости двух видов, *A. crataegi* и *U. ceramboides*. При умеренных концентрациях в гемолимфе, полиолы, вероятно, выполняют функцию низкомолекулярных шаперонов, участвующих в сборке крупных полипептидных агрегатов с широкой поверхностью, обеспечивающей функциональную эффективность этих лед-нуклеаторов. Эти факты указывают на то, что специализация физиологических механизмов адаптации, сформировавшихся в процессе эволюции, лежит в основе высокой резистентности насекомых к очень низким температурам, преобладающим в зимний период в Якутии.

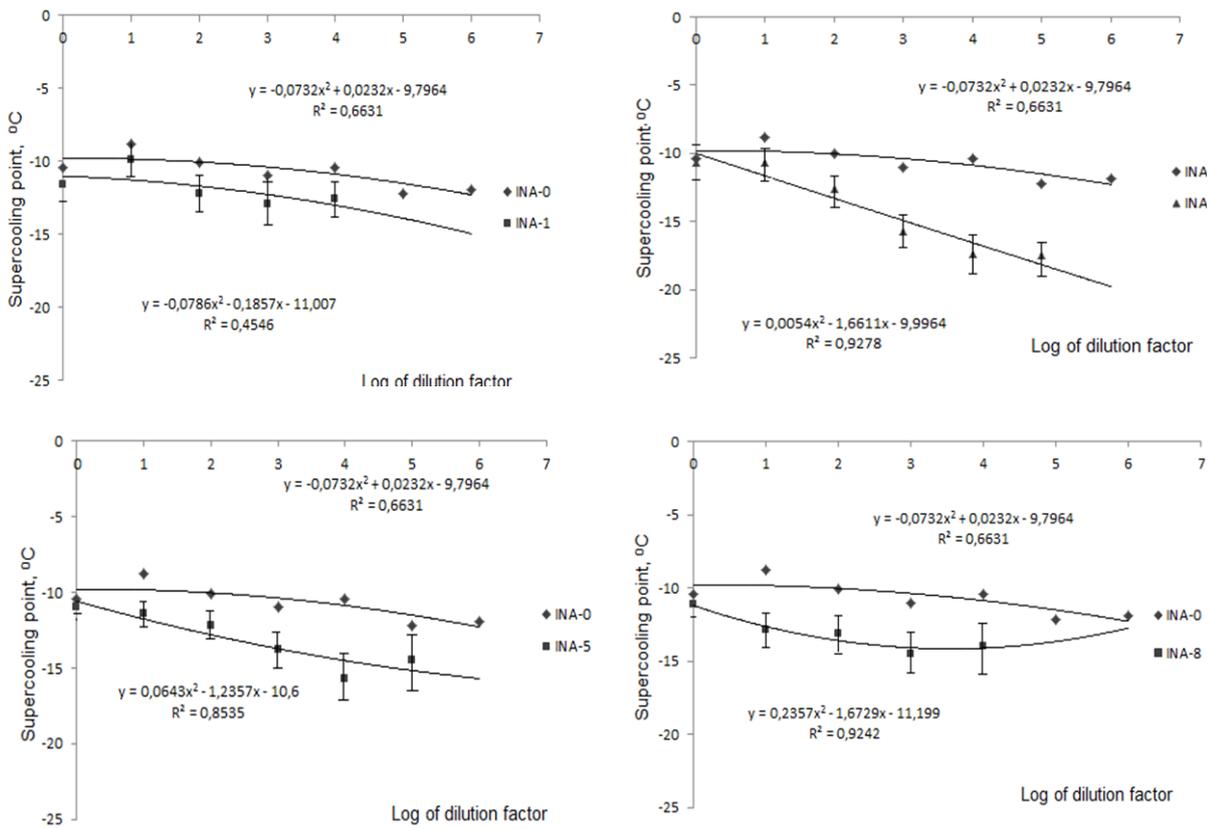


Рис. 5. Влияние изоволюметрического разбавления на специфическую лед-нуклеирующую активность гемолимфы гусениц *A. crataegi* в различной степени их акклиматизации при комнатной температуре (каждая точка представляет среднее значение 4 параллельных измерений образцов гемолимфы, взятой от 20 гусениц \pm SD). INA 0 – контроль (без акклимации); INA 1 – 1ый день акклимации; INA 2 – 2ой день акклимации; INA 5 – 5ый день акклимации; INA 8 – 8ой день (Li, 2012)

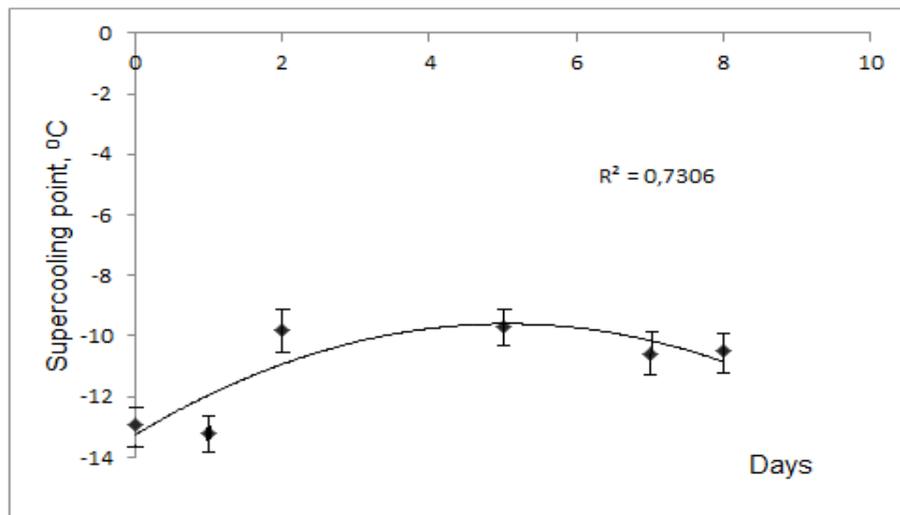


Рис. 6. Изменение температуры переохлаждения в процессе лабораторной акклимации *A. crataegi* (Li, 2011)

Глава 5. Водный баланс и стратегия холодоустойчивости у исследованных насекомых Якутии

Стратегии толерантности к низким температурам позволяют насекомым не только выдерживать пролонгированный период низких температур, но и сохранять энергетические и водные ресурсы. В регионах резко континентального климата влажность воздуха может быть очень низкой, как в зимний, так и летний периоды. Поэтому регуляция механизмов сохранения воды в организме также является основой сохранения жизнеспособности в столь суровых климатических условиях.

Для оценки водного баланса насекомых в данной работе был использован метод определения скорости дыхания и потери веса при стандартных условиях, разработанный Захариассеном и др. для пустынных жуков Восточной Африки (Zachariassen et al., 1987). Данный метод был применен к исследованию нескольких видов насекомых Якутии (рис. 7). Как видно на рис. 7, в

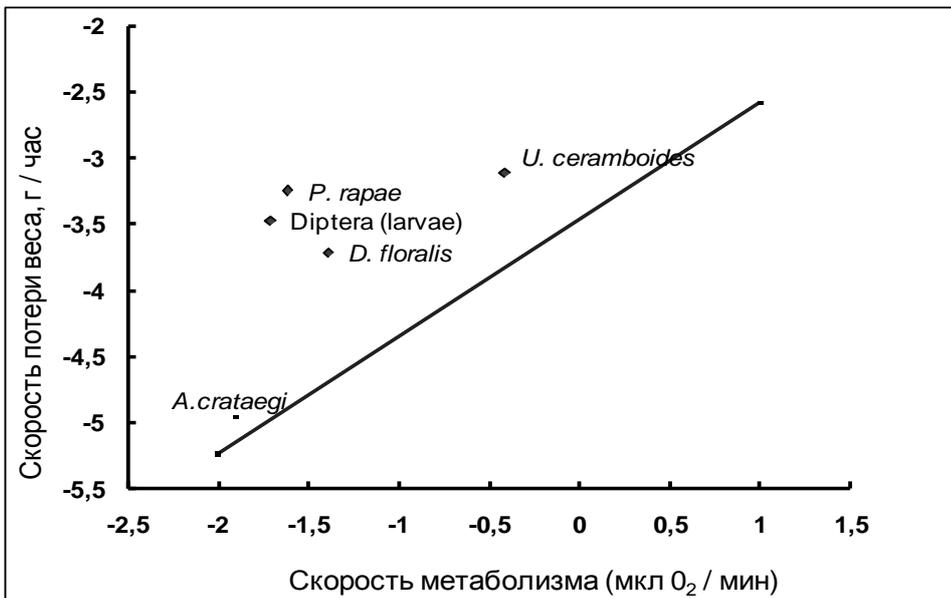


Рис. 7. Двойной логарифмический график скорости дыхания и скорости потери веса у некоторых насекомых Центральной Якутии, построенной относительно регрессионной линии, характеризующей водный баланс пустынных жуков Восточной Африки (Ли, Захариассен, 2006)

большинстве случаев морозоустойчивые насекомые имеют высокую кутикулярную проницаемость, как это было установлено для насекомых Скандинавии, характеризующейся влажным климатом (Zachariassen, Li et al.,

2008). Однако, для двух видов, *A. crataegi* L. и *A. aedilis* L. такой закономерности не наблюдалось (Рис. 7,8).

Исследования водного баланса *A. crataegi* L. показали, что в зимнее время содержание воды у насекомого поддерживается на постоянном уровне, а проницаемость кутикулярного покрытия сравнима с таковой для жуков Восточной Африки. Кроме того, в зимний период гусеницы упакованы в чехлики, которые также эффективно защищают их от потерь воды.

Удивительно то, что, несмотря на внеклеточную лед-нуклеацию, при которой вода находится в консервированной форме в зимнее время, эффективность водосохранения за счет низкой кутикулярной проницаемости у *A. crataegi* очень высока. Это связано с особенностями развития гусениц *A. crataegi*, обитающих на ветвях кустарника боярышника, т.е. в условиях слабой защищенности от неблагоприятных изменений влажности воздуха.

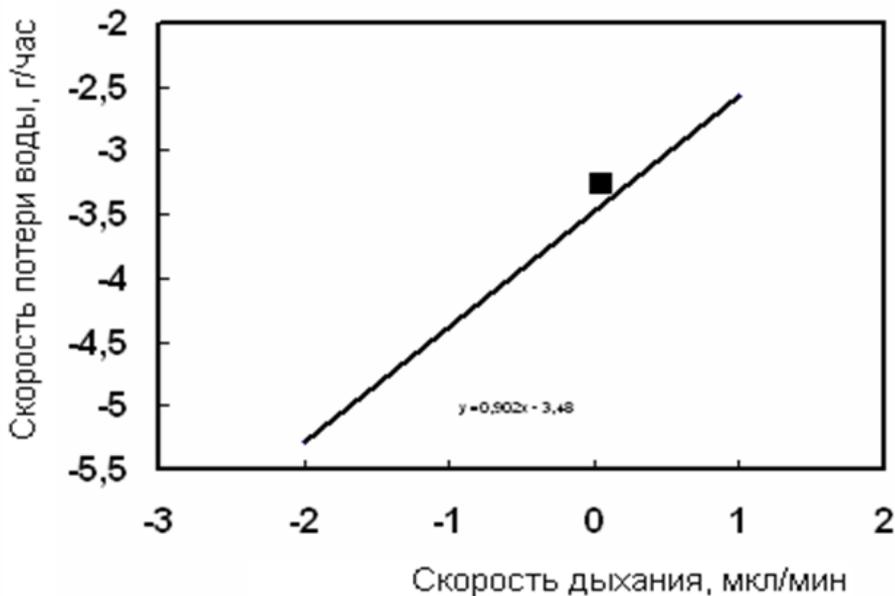


Рис. 8. Скорость потери воды и скорость метаболизма личинок *A. aedilis* (квадрат) относительно регрессионной линии показывающей связь между скоростью метаболизма и скоростью потери воды у жуков семейства Tenebrionidae и Carabidae, обитающих в пустынях Восточной Африки (Kristianssen, Li et al, 2008).

В конце июля они плетут листовые гнезда, прячутся в чехликах и, начиная с августа, когда температура воздуха еще довольно высокая (до +25⁰С)

прекращают питание и готовятся к длительной диапаузе. В этот период насекомые особенно подвержены риску потери воды. Поэтому наличие покровов с низкой проницаемостью для воды, а также уход в листовые гнезда являются необходимыми элементами приспособления к этим неблагоприятным условиям. Другим опасным периодом в отношении чрезмерной потери воды является май месяц, когда влажность воздуха в районе г. Якутска понижается до 30%, а питание вышедших из гнезд гусениц только начинается. Низкая водопроницаемость кутикулы является основным приспособлением к высокой сухости воздуха в этот период. Как было показано в данных исследованиях, насекомые, у которых весь цикл развития проходит в хорошо забуференных местах (личинки *Diptera*, пуппарии *Delia floralis*) характеризуются довольно высокой транскутикулярной проницаемостью (Рис. 7).

Личинки *A. aedilis* отличаются от других изученных морозоустойчивых насекомых не только более низкой температурой переохлаждения, но и высокой устойчивостью к потере воды (Рис. 8).

Этим сибирский вид *A. aedilis* похож на другие исследованные виды семейства *Cerambycidae*, для которых низкая кутикулярная проницаемость особенно важна в зимний период, когда они находятся длительное время в переохлажденном состоянии (Zachariassen et al. , 2007). Однако, данный вид, обитающий в Якутии, является в отличие от его аналога, обитающего в Скандинавии, морозоустойчивым. Вероятно, на механизм сохранения воды у *A. aedilis* влияет то, что в летнее время насекомые питаются корой деревьев, которая содержит слишком мало воды по сравнению, например, с листьями, чтобы такой тип питания мог бы компенсировать дефицит воды в окружающей среде. Поэтому наличие покровов, предотвращающих чрезмерное испарение воды, является необходимым приспособлением для данного вида в условиях сухого и жаркого климата в Якутии в летний период. Помимо этого, низкая кутикулярная проницаемость для воды у личинок *A. aedilis* позволяет им оставаться в переохлажденном состоянии в течение зимнего периода без значительных потерь воды. Однако, длительный период очень низких зимних температур в Якутии создает угрозу для выживания насекомых, находящихся в переохлажденном состоянии, которое, как известно, является метастабильным по своему характеру. Видимо по этой причине, эти насекомые развивают толерантность к замерзанию, природа которой в настоящее время неизвестна.

Рассматривая взаимосвязь между водным балансом насекомых и типом стратегии холодовой адаптации, можно предположить, что жуки с высокой

кутикулярной проницаемостью в процессе эволюции развили способность инициировать замерзание в области субнулевых температур, что позволяет им избегать значительных потерь воды в организме. Это свойство может быть для них важным физиологическим приспособлением в зимний период. Путем инициации замерзания при умеренной степени переохлаждения ($-5^{\circ}\text{C}\dots-10^{\circ}\text{C}$) они устанавливают баланс между фазовым давлением жидкости тела и замерзшей окружающей средой уже при этой субнулевой температуре. Насекомые, чья стратегия холодоустойчивости основана на способности к переохлаждению в процессе эволюции приобрели наружные покровы, структура которых ограничивает испарение воды в условиях ее дефицита, как в зимнее, так и летнее время. Однако, другие факторы, такие как место обитания, диета и др., модифицируют эти общие черты механизма поддержания водного баланса, что приводит к удивительной адаптационной пластичности, присущей этой группе живых организмов.

Глава 6. Холодовые адаптации насекомых: от физиологии к практическому применению

Как показано в данных исследованиях холодоустойчивые насекомые продуцируют вещества, обладающие криопротекторными или антифризными свойствами, чтобы защитить органы и ткани от холодового повреждения. К ним относятся полиолы, антифризные белки и лед-нуклеирующие соединения. В настоящих исследованиях на 7 видах насекомых показано, что они продуцируют глицерин в зимнее время. Фактически, холодоустойчивые насекомые представляют собой миниатюрную систему по биосинтезу криопротекторных соединений, практическое использование которых может быть вполне реальным при условии детального изучения структуры и свойств этих соединений, а также механизмов, посредством которых они осуществляют криопротекцию. Благодаря успехам, связанных с применением искусственных криопротекторов типа ДМСО, полиэтиленгликоля и др. в процедуре криоконсервирования, стало возможным использование этих веществ для сохранения клеток животных, растений, а также целых органов и тканей человека при низких температурах. Однако, использование проникающих криопротекторов все еще имеет ряд ограничений, поэтому поиск новых эффективных криопротекторов является весьма актуальным. В данной работе был предложен подход, связанный с использованием природных криопротекторных соединений, которые продуцируют холодоустойчивые насекомые Якутии. Рабочая гипотеза заключалась в том, что эволюция

холодовых стратегий насекомых в экстремально холодном регионе привела к продукции высокоспециализированных молекул, эффективно защищающих клетки от летального замерзания. В данной работе впервые был предложен метод применения экстракта зимних гусениц *A. crataegi* L. в криоконсервировании лимфоцитов периферической крови человека.

С этой целью из зимних гусениц боярышницы методом спиртовой экстракции была получена многокомпонентная смесь, обладающая криопротекторными свойствами. Методом тонкослойной хроматографии данная смесь была разделена на три основных компонента: глицерин (45,5%) (рис. 9), α -каротин (2,4%)(рис. 10) и соединение пептидной природы (39,6%)(рис. 11), состоящее из пролина, аспарагиновой кислоты, серина, треонина и глутаминовой кислоты с преимущественным содержанием пролина и глутаминовой кислоты (рис. 12).

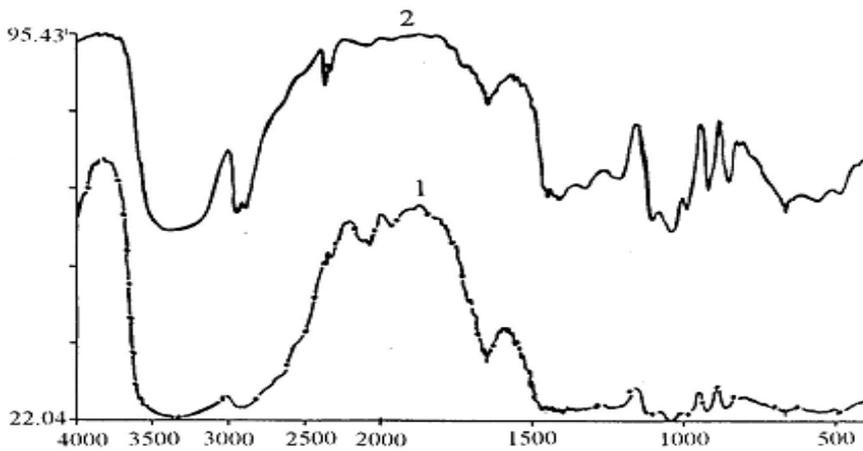


Рис. 9. ИК-спектры поглощения глицерин - содержащей фракции спиртового экстракта зимних гусениц *A. crataegi* и глицерина (в качестве маркера) в области длин волн 500-4000 cm^{-1} . 1 – спектр поглощения фракции спиртового экстракта, 2 – спектр поглощения глицерина (Ли и др., 2003)

Все три компонента образовывали довольно гомогенную смесь темно-коричневого цвета, вязкую по консистенции, с коэффициентом преломления n_D равным 1,472.

Оценка криопротекторной эффективности полученного экстракта была произведена в экспериментах по замораживанию лимфоцитов крови человека. Жизнеспособность лимфоцитов, замороженных в присутствии экстракта гусениц, сравнивали с жизнеспособностью лимфоцитов, замороженных в присутствии химического глицерина. Условия замораживания клеток до -25°C

во всех случаях были одинаковыми, продолжительность инкубации при заданной температуре составляла 2 часа.

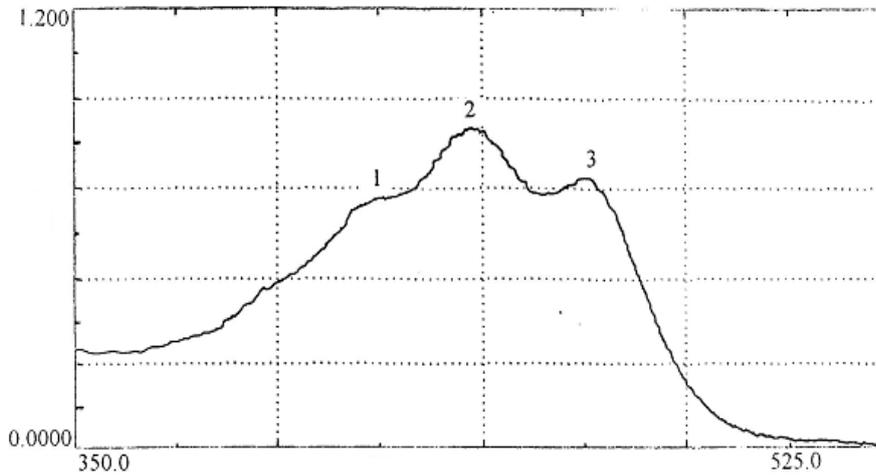


Рис. 10. Видимый спектр поглощения каротиноидной фракции спиртового экстракта *A. crataegi* в области длин волн 350-600 нм: 1 – $\lambda_{\max 1}$ 420 нм; $\lambda_{\max 2}$; 446 нм; $\lambda_{\max 3}$ 473 нм (Ли и др., 2003).

Полученные результаты показали, что эффективность криопротекторов, взятых в концентрации 16%, была самой высокой (рис. 13). Экстракт также проявлял стабилизирующий эффект при трехкратных циклах замораживания - оттаивания клеток. Как видно на рис. 13, 16% экстракт был более эффективным при многократном замораживании-оттаивании лимфоцитов (более чем в 3 раза) в сравнении с глицерином, взятом в эквивалентной концентрации.

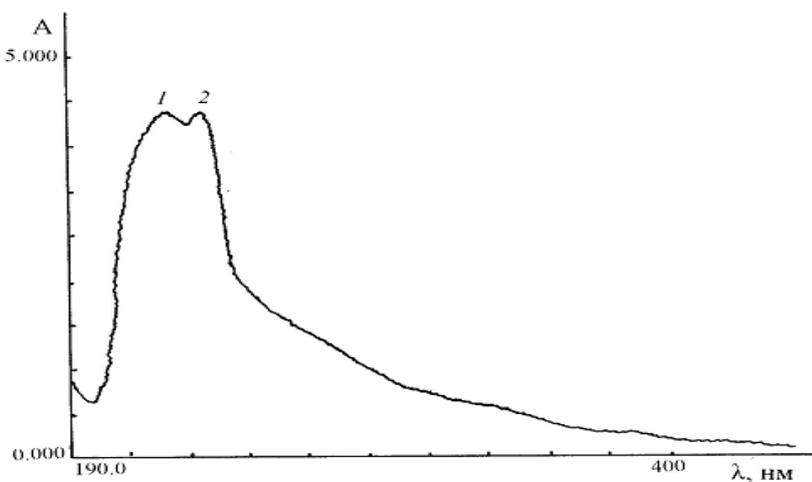


Рис. 11. UV VIS спектр поглощения пептидной фракции спиртового экстракта *A. crataegi* в области длин волн 190-400 нм: 1 – $\lambda_{\max 1}$ 211 нм; $\lambda_{\max 2}$ 225 нм

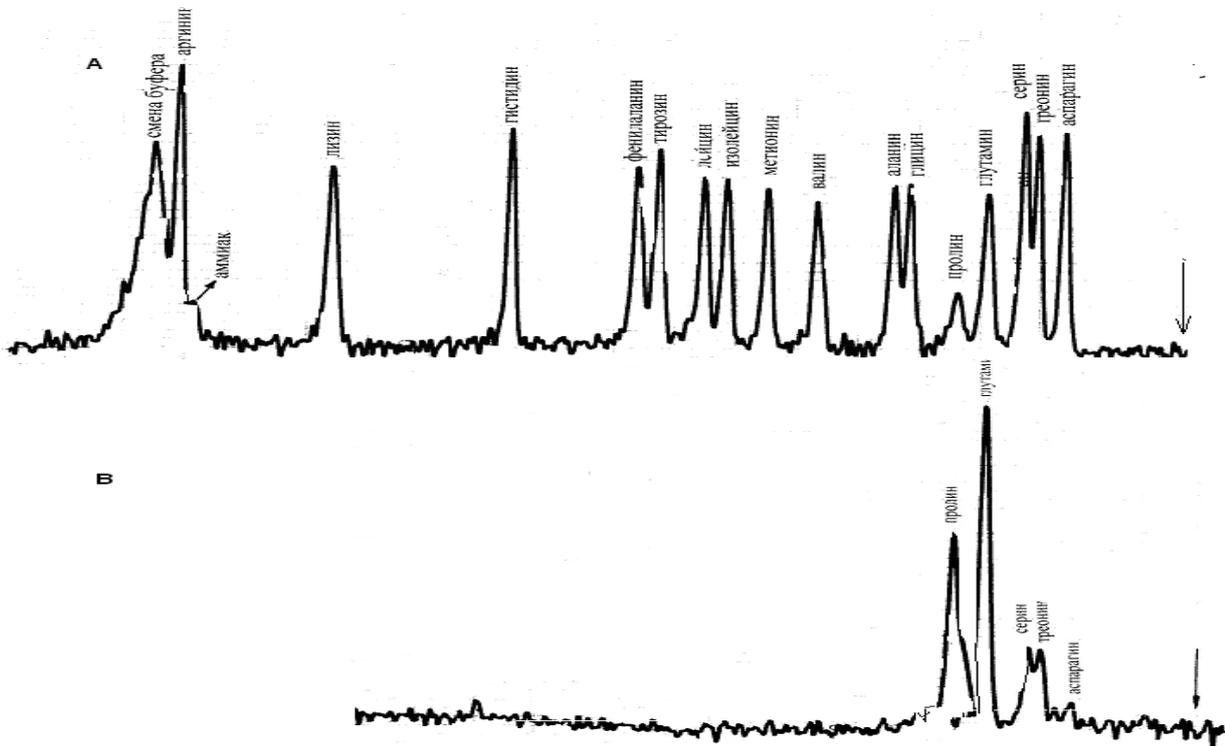


Рис. 12. Определение аминокислотного состава пептидной фракции спиртового экстракта *A. crataegi* нингидриновым методом (В), с помощью калибровочного графика стандартных аминокислот (А). Стрелками показан момент нанесения пробы (Ли и др., 2003).

Как было показано в данной работе, *A. crataegi* является морозоустойчивым видом, холодовая адаптация которого основана на продукции глицерина и лед-нуклеирующих белков, обеспечивающих контролируемое лед-образование (Ли, 2006; Li, 2012). В зимний период гусеницы *A. crataegi* толерантны к температуре -85°C , а в летний период они становятся морозочувствительными.

Возможно, что функция каротинов связана с реактивацией лимфоцитов при их оттаивании. О важной роли антиоксидантов в сохранении клеток при криоконсервации сообщалось в ряде работ (Oditzova et al., 2009; Motta et al., 2010). Механизмы этих процессов требуют детального и более глубокого изучения в будущем.

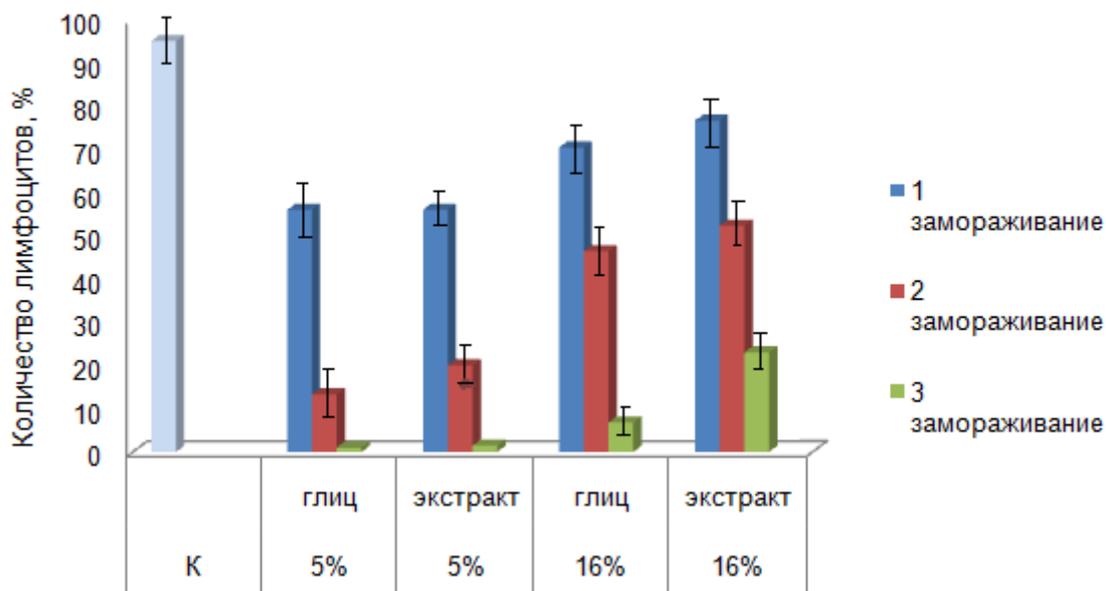


Рис. 13. Количество живых лимфоцитов крови человека (%), замороженных в присутствии экстракта *Aporia crataegi* L. и глицерина (в качестве контроля было взято количество лимфоцитов до замораживания)(Ли и др., 2003)

Выводы

1. Доминирующей стратегией адаптации к холодному климату Якутии у исследованных насекомых является устойчивость к замерзанию. Анализ 29 видов, принадлежащих к отрядам Coleoptera, Diptera, Lepidoptera показал, что 93,3% из изученных видов являются морозоустойчивыми и только 6,7% - морозочувствительными.
2. Одна из причин преобладания стратегии морозоустойчивости заключается в более сильном криопротекторном эффекте полиолов, в частности глицерина у морозоустойчивых видов в сравнении с эффектом этих соединений у морозочувствительных насекомых, что было показано на зимних гусеницах бабочки боярышницы *A. crataegi*. Высокий криопротекторный эффект глицерина обусловлен его участием в формировании и возможно стабилизации высокомолекулярных лед-нуклеирующих полипептидных ассоциатов, активность которых обеспечивает устойчивость данного вида к ультранизким температурам.
3. Другая причина преобладания устойчивости к замерзанию, возможно, связана со сменой стратегии адаптации у некоторых насекомых, что было показано на трех видах, *Cossus cossus*, *Pieris rapae* и *Acanthocinus aedilis*. В Северной Европе эти виды являются морозочувствительными, в то время

как в условиях очень холодного климата Центральной Якутии они развивают устойчивость к замерзанию.

4. *Rhagium inquisitor*, морозочувствительный жук, обитающий в Центральной Якутии, является очень холодоустойчивым видом. Физиологические механизмы холодовой адаптации позволяют данному виду выдерживать как короткие, так и пролонгированные периоды низких и ультранизких зимних температур.
5. Определен характер сезонных изменений физико-химических свойств гемолимфы жука *U. ceramboides*. Высоковероятный процесс контролируемого лед-образования в гемолимфе связан с присутствием значительных концентраций эндогенных белковых лед-нуклеаторов, которые наряду с синтезом таких криопротекторов, как сорбитол и трейтол обуславливают толерантность данного вида жука к ультранизким температурам.
6. Исследование сезонных изменений температуры переохлаждения и профиля лед-нуклеирующей активности у морозоустойчивых насекомых, *U. ceramboides* и *A. crataegi*, показало, что температура переохлаждения сама по себе не отражает характера адаптационного процесса у насекомых. В то же время, по профилю лед-нуклеирующей активности можно судить, является ли лед-нуклеация в гемолимфе насекомых чертой адаптационного процесса.
7. Результаты по изучению взаимосвязи между типом стратегии адаптации к холоду и устойчивостью к низкой влажности воздуха, установленной для некоторых видов насекомых Центральной Якутии, указывают на то, что жуки с высокой кутикулярной проницаемостью развили способность инициирования замерзания в области субнулевых температур. Это позволяет им избегать значительных потерь воды в организме в зимний период. Однако, в жаркий летний период насекомые Якутии также подвергаются влиянию очень сухого воздуха и поэтому некоторые из них (*A. crataegi*) подобно морозочувствительным видам приобрели кутикулу с низкой транскутикулярной проницаемостью для воды.
8. В данной работе впервые оценена возможность использования экстракта зимних гусениц *A. crataegi* для криосохранения лимфоцитов периферической крови человека. В концентрации 16%, экстракт был

максимально эффективен как криопротектор при замораживании лимфоцитов до -25°C , а также при многократных циклах замораживания - оттаивания клеток.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в системы цитирования WoS, Scopus:

1. Li N.G. Cold hardiness of insects distributed in the area of Siberian Cold Pole // J. Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology. 2007. V. 146A. P. 156 -157.
2. Zachariassen K.E., Kristiansen E., Pedersen S., Li N.G. (2007). Ionic regulation of insects during cold exposure and dehydration stress // J. Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular & Integrative Physiology. 2007. V. 146A. P. 150-151.
3. Zachariassen K.E., Li N.G. , Laugsand A.E., Kristiansen E., Pedersen S.A. Is the strategy for cold hardiness in insects determined by their water balance? A study on two closely related families of beetles: Cerambycidae and Chrysomelidae // J. Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. 2008. V. 178. N 8. P. 977-984.
4. Kristiansen E, Li N.G., Averensky A.I., Zachariassen K.E. The Siberian timberman *Acanthocinus aedilis*: a freeze-tolerant beetle with low supercooling points // J Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. 2009. V. 179. P. 563-568.
5. Li N.G., Osakovsky V.L., Ermakova Y.V. Insects with low supercooling points distributed in the area of the Asian Cold Pole // Cryobiology. 2009. V. 59. P. 403 - 404.
6. Li N.G. Relationships between cold hardiness, and ice nucleating activity, glycerol and protein contents in the hemolymph of caterpillars, *Aporia crataegi* L. // Cryoletters. 2012. V. 33(2). P. 134 -142.

Статьи в отечественных журналах, рекомендованных ВАК:

7. Ли Н. Г., Осаковский В. Л., Иванова С.С. Химический состав и криопротекторная активность спиртового экстракта зимних гусениц *Aporia crataegi* L. // Известия РАН. Серия биологическая. 2003. № 5. С. 547- 552.
8. Ли Н. Г., Захариассен К. Е. Водный баланс и стратегия адаптации насекомых Центральной Якутии к экстремальным климатическим условиям // Известия РАН. Серия биологическая. 2006. № 5. С. 596 - 601.
9. Ли Н.Г. Физиолого-биохимические адаптации *Aporia crataegi* L. к сухому и холодному климату Центральной Якутии // Евроазиатский Энтомологический журнал. 2006. № 1. С. 173 – 180.
10. Ли Н. Г., Аверенский А. И. Некоторые биофизические аспекты холодовой адаптации у насекомых, обитающих в Центральной Якутии // Биофизика. 2007. Т. 52, №4. С. 747 – 752.
11. Ли Н. Г., Осаковский В. Л. О пластичности адаптационных процессов холодоустойчивых насекомых // Известия РАН. Серия биологическая. 2008. Т. 35, № 4. С. 459 – 463.
12. Ли Н.Г. Некоторые физиологические черты стратегии морозустойчивости *Aporia crataegi* L (Lepidoptera: Pieridae) и *Upis ceramboides* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), обитающих в Центральной Якутии // Энтомологическое обозрение. 2011. Т. 82. С. 3 - 10.

Патенты:

13. Ли Н. Г., Осаковский В. Л., Иванова С.С. “Природный криопротектор” // Патент на изобретение № 2178463. М., 2001. Бюлл. № 2.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Украины

14. Ли Н. Г. Экофизиологические особенности холодовой адаптации жуков *Upis ceramboides*, обитающих в Центральной Якутии // Проблемы криобиологии. 2006. Т. 13. № 3. С. 310 - 317.
15. Ли Н. Г. Льдонуклеирующая активность гемолимфы *Upis ceramboides*, обитающего в Центральной Якутии // Проблемы криобиологии. 2011. Т. 21, № 1. С. 34 – 46.

16. Ли Н. Г. Типы стратегий холодových адаптаций у насекомых, обитающих в Центральной Якутии // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 3. С. 328.

17. Ли Н. Г. Точка переохлаждения и специфическая льдонуклеирующая активность как параметры оценки холодоустойчивости насекомых // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 3. С. 329.

Главы в монографии:

18. Zachariassen K.E., Duman J.G., Kristiansen E., Pedersen S., Li N.G. Ice Nucleation and Antifreeze Proteins in Animals // In: Biochemistry and Function of Antifreeze Proteins. Ed. Steffen P. Graether, New York: Nova Science. 2011. P. 73-104.

Электронные издания

19. Ли Н.Г. Механизмы адаптации насекомых к экстремальным климатическим условиям Якутии // Отчет по проекту РФФИ 06-04-96048-p_восток_a. 2008. 12 С.

Другие издания

20. Ли Н.Г., Каймук Е.Л., Осаковский В.Л. Физиолого-биохимические исследования холодоустойчивости диапазирующих гусениц боярышницы *Aporia crataegi* L. // В сб. Некоторые итоги биохимических и физиологических исследований в республике Саха (Якутия). 2000. Якутск. С. 238-240.

21. Иванова С.С., Ли Н.Г. (2000). Криопротекторная эффективность биологических антифризов и пути их практического применения // В сб. Интеллект молодых ученых – XXI веку. 2000. Якутск. Р. 66-68.

22. Иванова С.С., Ли Н.Г. Исследование физиолого-биохимических аспектов низкотемпературной адаптации *Aporia crataegi* L. // В сб. Научные исследования аспирантов и молодых ученых. 2000. Вып. 2. Якутск. С. 39.

23. Ли Н.Г. Современные представления о природе холодной устойчивости насекомых // В сб. Энтомологические исследования в Якутии. 2003. Якутск. С. 138-148.

24. Ли Н.Г., Осаковский В.Л., Аммосов Ю.Н. Исследования липидов насекомых Якутии в период зимней диапаузы // В сб. Энтомологические исследования в Якутии. 2003. Якутск. С.148-155.

25. Ли Н.Г. Проблемы криоконсервации целых органов // Якутский Медицинский журнал. 2004. № 2(6). С. 31 – 32.
26. Ли Н.Г. Некоторые результаты криобиологических исследований в Якутии // Ж. Наука и техника в Якутии. 2004. № 2(5). С.15-18.
27. Ли Н.Г. Экофизиологические исследования холодových адаптаций насекомых Якутии // В сб. Исследования членистоногих животных в Якутии. 2008. С. 27-30.
28. Ли Н.Г. Криобиология: низкотемпературные исследования биологических систем // Якутский медицинский журнал. 2009. №4. С. 123 - 125.
29. Ли Н.Г. О необходимости включения предмета «Основы криобиологии» в учебные программы общеобразовательных школ и ВУЗов Якутии // Материалы научно-практической конференции Лиги женщин Якутии. 2009. Якутск. С. 85 – 88.
30. Ли Н.Г. Современные проблемы длительной криоконсервации биологических объектов (тканей, клеток, органов) с сохранением их свойств и функций на основе использования криопротекторных соединений // Якутский Медицинский журнал. 2011. № 21(1). С. 34 – 46.
31. Ли Н.Г. Криобиология насекомых, обитающих в экстремально холодных регионах // Ж. Наука и техника в Якутии. 2012. № 2. С. 10-13 .
32. Ли Н.Г. Потенциал холодоустойчивости летних насекомых на примере *Upis ceramboides* (Coleoptera: Tenebrionidae), обитающего в Центральной Якутии // Амурский зоологический журнал. 2013. V. 4. С. 391-395.

Тезисы конференций

33. Ли Н.Г., Иванова С.С., Алексеев А.А., Каймук Е.Л. Использование аналитических методов для изучения природных криопротекторных соединений, продуцируемых холодоустойчивыми насекомыми Якутии // Материалы конференции «Аналитика Сибири и Дальнего востока» . Новосибирск. 2000. С. 68-69.
34. Ли Н.Г., Алексеев А.А., Осаковский В.Л. Использование метода инфракрасной спектроскопии для химической идентификации соединений , выполняющих ризоазащитную функцию у холодоустойчивых насекомых Якутии

// XXII съезд по спектроскопическим методам исследования. Звенигород. 2001. С. 121.

35. Li N.G., Vinokurov N.N., Ivanova S.S., Osakovsky V.L. The investigation role of multicomponent cryoprotective system in the cold hardiness of *Aporia crataegi* L. inhabiting central Yakutia // Abstracts IV-th European Workshop of Invertebrate Ecophysiology. St-Peterburg, September, 9-15, 2001. P. 111.

36. Li N.G., Vinokurov N.N. Cold hardiness of *Aporia crataegi* L. inhabiting Central Yakutia // International Symposium "Permafrost Ecosystem and Global Climatic Changes". Yakutsk, August, 10-15, 2002. P. 252.

37. Ли Н.Г. Использование аналитических методов для изучения физиолого-биохимических механизмов толерантности насекомых к экстремальным климатическим условиям Якутии // Материалы Всероссийской конференции «Аналитики Сибири и Дальнего Востока». Звенигород, сентябрь 2-4, 2004. С. 630-631.

38. Li N.G. Biological active substances produced by highly cold hardy *Upis ceramoides* beetles inhabiting in Yakutia // ICAS-2006, July, 25-30, Moscow. P. 65.

39. Ли Н.Г. Эколого-физиологические исследования феномена холодоустойчивости насекомых центральной Якутии // Материалы Всероссийской конференции «Биологические проблемы криолитозоны», посвященной 60-летию со дня образования ИБПК СО РАН. 30 июля – 5 августа, Якутск. 2012. С. 116.

40. Ли Н.Г. Сравнительный анализ водного баланса *Acanthocinus aedilis* L. и *Aporia crataegi* L., обитающих в Якутии // Материалы Всероссийской конференции «Биологические проблемы криолитозоны», посвященной 60-летию со дня образования ИБПК СО РАН. 30 июля – 5 августа, Якутск. 2012. С. 117.

41. Li N.G., Osakovsky V.L. Relationships between cold hardiness, and ice nucleating activity, glycerol and protein contents in the hemolymph of caterpillars, *Aporia crataegi* L. // 4th International symposium on the environmental physiology of ectotherms & plants. Rennes, 2011. July 18-22. P. 56.

42. Li N.G., Kershengoltz B.M., Remigajlo P. Cold adaptation of insects inhabiting East Siberia, Russia: from physiology to practical perspectives // 5th International

symposium on the environmental physiology of ectotherms & plants. London, Ontario, Canada, 2013. August 12 - 16. P. 60.

43. Li N.G., Osakovsky V.L. Some features of a seasonal cold hardiness of *Upis ceramboides* beetles inhabiting East Siberia, Russia // 5th International symposium on the environmental physiology of ectotherms & plants. London, Ontario, Canada, 2013. August 12 - 16. P. 84.

44. Li N.G. Physiological mechanisms of adaptation of *Aporia crataegi* L. to extreme low winter temperatures and seasonal low water availability in Yakutia (Eastern Siberia, Russia) // 2nd Global Conference on Entomology (GCE-2). Kuching, Malaysia, 2013. November 8-12. P.180-181

45. Li N.G. On the question of parameters for evaluating of insect cold hardiness // 2nd Global Conference on Entomology (GCE-2). Kuching, Malaysia, 2013. November 8-12. P. 294