

СОДЕРЖАНИЕ

Том 65, номер 2, 2020

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Хиральность как физическая основа иерархической периодизации структур биомакромолекул <i>Е.В. Малышко, А.Р. Муртазина, В.А. Твердислов</i>	213
Молекулярно-динамическое моделирование связанных с атомарными кластерами полиамфолитных полипептидов на поверхностях металлоподобных нанообъектов <i>Н.Ю. Кручинин, М.Г. Кучеренко</i>	219
Изменение функциональной активности пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным изотопным $^2\text{H}/^1\text{H}$ составом <i>С.В. Козин, А.А. Кравцов, К.К. Туроверов, А.В. Фонин, Е.В. Чихиржина, В.В. Малышко, А.В. Моисеев, А.В. Чуркина</i>	229
Роль линкерных гистонов в структурной организации хроматина. 2. Взаимодействие с ДНК и ядерными белками <i>Е.В. Чихиржина, Т.Ю. Старкова, А.М. Поляничко</i>	237
Исследования изменений конформации гема и глубина при нормобарической гипоксии <i>О.В. Слатинская, О.Г. Лунева, Л.И. Деев, С.Н. Орлов, Г.В. Максимов</i>	250
Анализ рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа А методом поверхностного плазмонного резонанса <i>Г.С. Онхонова, П.Ю. Торжкова, В.Ю. Марченко, С.В. Святченко, А.С. Гудымо, А.Б. Рыжиков</i>	259
Анализ экспрессии генов цветения в сорте нута CDC Frontier методами машинного обучения <i>Б.С. Подольный, В.В. Гурский, М.Г. Самсонова</i>	263
Следы экологической адаптации в геномах староместных сортов нута <i>А.Б. Соколкова, П.Л. Чанг, Н. Карраскила-Гарсия, Н.В. Нуждина, Д.Р. Кук, С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова</i>	276
Генетические варианты, ассоциированные с продуктивностью и содержанием белка и масла у сои <i>А.А. Канапин, А.Б. Соколкова, А.А. Самсонова, А.В. Щегольков, С.В. Болдырев, А.Ф. Аюпова, Ф.Е. Хайтович, С.В. Нуждин, М.Г. Самсонова</i>	280

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Течение цитоплазмы как внутриклеточный конвейер: влияние на фотосинтез и потоки H^+ в клетках <i>Chara</i> <i>А.А. Бульчев, А.В. Алова, Н.А. Крупенина, А.Б. Рубин</i>	290
Анализ устойчивости системы внутриклеточной сигнализации PI3K–Akt–mTOR <i>Т.С. Сапега, Г.Т. Гурия</i>	300
Особенности энергообеспечения гепатоцитов в условиях различного содержания в рационе нутриентов <i>О.Н. Волощук, Г.П. Копыльчук, К.А. Тазырова</i>	310
Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия <i>Н.В. Лобышева, С.В. Нестеров, Ю.А. Скоробогатова, В.И. Лобышев</i>	315

Исследование макрофагальной дифференцировки клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах

М.И. Кобякова, Я.В. Евстратова, А.С. Сенотов, А.И. Ломовский, В.В. Новикова, К.С. Краснов, И.С. Фадеева, В.С. Акатов, Р.С. Фадеев

320

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Стимуляция роста растений водным раствором, активированным плазмой тлеющего разряда

С.В. Белов, Л.М. Апашева, Ю.К. Данилейко, А.Б. Егоров, А.В. Лобанов, В.И. Луканин, Е.Н. Овчаренко, В.В. Савранский, Л.Г. Шилин

326

Сезонные изменения флуоресценции хлорофилла водоемов Звенигородской станции Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Д.Н. Маторин, Н.П. Тимофеев, Д.А. Тодоренко, Л.Б. Братковская, С.Н. Горячев

331

Влияние экзогенного пероксиредоксина b на функциональные параметры изолированной почки крысы

А.Е. Гордеева, М.Г. Шарапов, В.А. Евдокимов, В.И. Новоселов, Е.Е. Фесенко

340

Защитный эффект химерного фермента-антиоксиданта PSH при ишемически-реперфузионном поражении почек

Р.Г. Гончаров, Г.И. Фильков, А.В. Трофименко, В.В. Бояринцев, В.И. Новоселов, М.Г. Шарапов

349

Сравнительное экспериментальное изучение противоопухолевой активности аурумакрила и цитостатиков различного механизма действия

Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, К.А. Абзаева

360

Окислительная модификация белков в тканях крыс при опухолевом росте в условиях озono-фотодинамического воздействия

Т.Г. Щербатюк, Е.С. Жукова (Плеханова), Ю.В. Никитина, А.Б. Гапеев

367

Применение ЭПР-спектроскопии в изучении метаболизма железа при болезни Паркинсона

Г.Т. Рихирева, М.Г. Маклецова

376

Моделирование теплофизических процессов в пчелином улье с электроподогревом

С.В. Оськин, Д.А. Овсянников

381

Оправдался ли долгосрочный прогноз риска вымирания азовского судака?

Ю.В. Тютюнов, И.Н. Сенина, Л.И. Титова, Л.В. Дашкевич

390

Пороговая характеристика ретино-гипоталамического тракта управления циркадианной активностью человека солнечным излучением

А.В. Леонидов

402

ДИСКУССИИ

Структурные превращения в жидкой воде

А.Н. Смирнов, А.В. Савин, А.С. Сигов

408

Электрон-колебательные возбужденные комплексы в ферментативных реакциях

Н.Л. Векшин

412

Contents

Vol. 65, No. 2, 2020

Molecular Biophysics

- Chirality as a Physical Basis of Hierarchical Periodization of Biomacromolecular Structures
E.V. Malyshko, A.R. Murtazina, and V.A. Tverdislov 213
- Molecular Dynamics Simulation Polyampholyte Polypeptides Associated with Atomic Clusters on the Surfaces of Metal-Like Nanoobjects
N.Yu. Kruchinin and M.G. Kucherenko 219
- Change of Functional Activity of Horseradish Peroxidase and Bovine Serum Albumin in Media with Various Isotopic $^2\text{H}/^1\text{H}$ Composition
S.V. Kozin, A.A. Kravtsov, K.K. Turoverov, A.V. Fonin, E.V. Chihirzhina, V.V. Malyshko, A.V. Moiseev, and A.V. Churkina 229
- The Role of the Linker Histones in Chromatin Structural Organization. 2. The Interactions with DNA and Nuclear Proteins
E.V. Chikhirzhina, T.V. Starkova, and A.M. Polyanchko 237
- Study of Conformational Changes in Heme and Globin in Temperature Variation and Normobarical Hypoxia
O.V. Slatinskaya, O.G. Luneva, L.I. Deev, S.N. Orlov, and G.V. Maksimov 250
- Analysis of Receptor Specificity of Influenza A Virus Strains by Surface Plasmon Resonance
G.S. Onkhonova, P.Yu. Torzhkova, V.Yu. Marchenko, S.V. Svyatchenko, A.S. Gudymo, and A.B. Ryzhikov 259
- Machine-Learning Analysis of Flowering Gene Expression in CDC Frontier Chickpea Cultivar
B.S. Podolny, V.V. Gursky, and M.G. Samsonova 263
- Signatures of Ecological Adaptation in Genomes of Chickpea Landraces
A.B. Sokolkova, P.L. Chang, N. Carrasquilla-Garcia, N.V. Nuzhdina, D.R. Cook, S.V. Nuzhdin, and M.G. Samsonova 276
- Genetic Variants Associated with Productivity and Protein and Oil Content in Soybeans
A.A. Kanapina, A.B. Sokolkova, A.A. Samsonova, A.V. Schegolkov, S.V. Boldyrev, A.F. Aupova, P.E. Khaitovich, S.V. Nuzhdin, and M.G. Samsonova 280
-

Cell Biophysics

- Cytoplasmic Streaming as an Intracellular Conveyor: Effects on Photosynthesis and H^+ Fluxes in *Chara* Cells
A.A. Bulychev, A.V. Alova, N.A. Krupenina, and A.B. Rubin 213
- Stability Analysis of PI3K–Akt–mTOR Intracellular Signaling Pathway
T.S. Sapega and G.Th. Guria 213
- Peculiarities of Hepatocyte Energy Metabolism when the Nutrient Content in the Chow Diet Varies
O.N. Voloshchuk, G.P. Kopylchuk, and K.A. Tazirova 213
- Functional Activity of Mitochondria in Deuterium Depleted Water
N.V. Lobysheva, S.V. Nesterov, Yu.A. Skorobogatova, and V.I. Lobyshev 213
- The Study of Macrophage Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells in Multicellular Aggregates
M.I. Kobyakova, Ya.V. Evstratova, A.S. Senotov, A.I. Lomovsky, V.V. Novikova, K.S. Krasnov, I.S. Fadeeva, V.S. Akatov, and R.S. Fadeev 213
-

Complex Systems Biophysics

Stimulation of Plant Growth with Aqueous Solution Activated by Glow Discharge Plasma <i>S.V. Belov, L.M. Apasheva, Yu.K. Danileiko, A.B. Egorov, A.V. Lobanov, V.I. Lukanin, E.N. Ovcharenko, V.V. Savransky, and L.G. Shilin</i>	326
Seasonal Changes of Chlorophyll Fluorescence in Reservoirs of the Zvenigord Station of Lomonosov Moscow State University <i>D.N. Matorin, N.P. Timofeev, D.A. Todorenko, L.B. Bratkovskaya, S.N. Goryachev</i>	331
The Effect of Exogenous Peroxiredoxin 6 on Functional Parameters of Isolated Rat Kidney <i>A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, V.A. Evdokimov, V.I. Novoselov, and E.E. Fesenko</i>	340
Protective Effect of Chimeric PSH Antioxidant Enzyme in Renal Ischemia-Reperfusion Injury <i>R.G. Goncharov, G.I. Filkov, A.V. Trofimenko, V.V. Boyarintsev, V.I. Novoselov, and M.G. Sharapov</i>	349
Comparative Experimental Study of Antitumor Activity between Aurumacryl and Cytostatics with Different Mechanisms of Action <i>L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, N.V. Bluhterova, M.M. Fomina, V.A. Rikova, and K.A. Abzaeva</i>	360
Oxidative Modification of Proteins in Tissues of Tumor-Bearing Rats after Ozone-Photodynamic Therapy <i>T.G. Shcherbatyuk, E.S. Zhukova (Plekhanova), Ju.V. Nikitina, and A.B. Gapeyev</i>	367
Application of EPR-Spectroscopy in Studies of Iron Metabolism in Parkinson's Disease <i>G.T. Rikhireva and M.G. Makletsova</i>	376
Modeling of Thermophysical Processes in Electrically Heated Hives <i>S.V. Oskin and D.A. Ovsyannikov</i>	381
Long-Range Prediction of the Risk of Extinction Faced by the Pikeperch in the Azov Sea: Has the Prediction Come True? <i>Yu.V. Tyutyunov, I.N. Senina, L.I. Titova, and L.V. Dashkevich</i>	390
The Threshold Characteristics of the Retino-Hypothalamic Tract in the Regulation of Human Circadian Activity Rhythm by Solar Radiation <i>A.V. Leonidov</i>	402

Discussions

Structural Transformation in Liquid Water <i>A.N. Smirnov, A.V. Savin, and A.S. Sigov</i>	408
Electronically-Vibrationally Excited Complexes in Enzymatic Reactions <i>N.L. Vekshin</i>	412

ХИРАЛЬНОСТЬ КАК ФИЗИЧЕСКАЯ ОСНОВА ИЕРАРХИЧЕСКОЙ ПЕРИОДИЗАЦИИ СТРУКТУР БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

© 2020 г. Е.В. Малышко, А.Р. Муртазина, В.А. Твердислов

Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: katyamalyshko@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2019 г.

После доработки 15.01.2020 г.

Принята к публикации 16.01.2020 г.

Предложена и обоснована универсальная система классификации уровней молекулярных структур живой клетки как иерархии знакопеременных хиральных конструкций, отражающая физическую (термодинамическую/энтропийную) основу внутримолекулярного и надмолекулярного фолдинга. Выделены тенденции межмолекулярных хиральных соответствий, характерных для взаимодействий макромолекул одного и разного типов на соответствующих уровнях молекулярной организации (белок–белок–L-L; нуклеиновые кислоты–ДНК–РНК–D-D; белок–нуклеиновые кислоты L-D; белки и нуклеиновые кислоты с L-липидами мембран – в соответствии со знаком хиральности соответствующего уровня организации структуры макромолекул).

Ключевые слова: хиральность, энантимеры, белки, цитоскелет.

DOI: 10.31857/S0006302920020015

Понятия симметрии и нарушения симметрии имеют фундаментальное значение не только в физике, но, по-видимому, и в науках о живых системах. При этом речь идет не столько о проявлениях симметрии, формирующих структуры и явления, сколько о базовых принципах. Важной особенностью живых систем является иерархическая сопряженность их структур и функций. Мы полагаем, что воспроизведение характерных паттернов в самоорганизующихся структурах разного уровня с изменяющимися физическими механизмами структурообразования основывается на единых симметричных принципах. Эволюционно сформировавшаяся и ставшая базовой система четко стратифицированных уровней макромолекулярных и надмолекулярных биологических структур основана на явлении хирального дуализма [1, 2]. В живых системах был замечен, а затем обнаружен и в неживых системах, общий системный принцип спонтанного формирования дискретных иерархических структур в исходно гомохиральных системах. Его характерная особенность проявляется в формировании череды вложенных или параллельно развивающихся структур с подобным или изменяющимся типом симметрии, возрастающим масштабом и, что принципиально важно, изменяющимся знаком хиральности [3]. Как мы поясним ниже, гомохиральные системы в принципе неравновесны и

способны к структурным перестройкам в ходе диссипации свободной энергии.

Явление хиральности в живых системах в последнее время привлекает все большее внимание исследователей. При этом множатся экспериментальные данные, подходы и мнения по вопросу о земном или космическом его происхождении. Однако странным образом не поднимается вопрос о биологической значимости данного феномена – эволюционно отобранного и закрепившегося общебиологического признака живого. В принципе, можно представить себе «живую материю», полностью составленную из ахиральных молекул.

Анализируя проблему структурных и функциональных иерархий в живых системах, мы встречаемся с ярким воплощением реализуемого природой системного принципа – «использовать» удачные структурные находки или какие-либо спонтанно протекающие процессы неживой природы, обращая их в подходящие функции. Так, всеобщая иерархичность природы является функционально значимым атрибутом всех биологических систем, поскольку позволяет сочетать разномасштабные процессы в пространстве и времени, сопрягая их в различных жизненных проявлениях. Центральным утверждением в развиваемой нами концепции является положение о том, что образование молекулярно-биологиче-

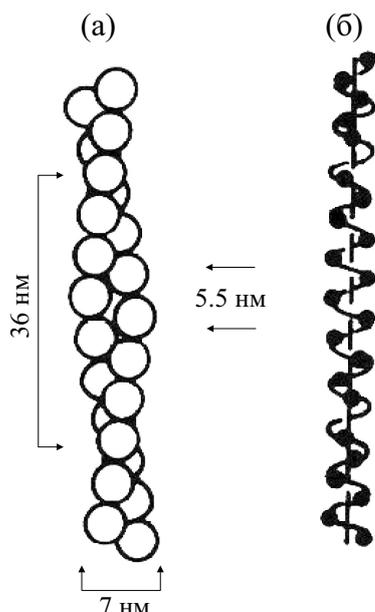


Рис. 1. Схематическое изображение структуры F-актина, определенное с помощью электронной микрофотографии: (а) — микрофиламент — двухцепочечная правая спираль; (б) — воображаемая спираль, проходящая через каждый мономер актина, следующий выше по оси микрофиламента (адаптировано из работы [6]).

ских иерархий непосредственно связано с явлением хиральности.

Ранее нами была описана новая общая закономерность, характерная для процессов структурообразования в исходно гомохиральных системах живой и неживой природы [1–5]. Было обнаружено, что в молекулах белков и нуклеиновых кислот, имеющих гомохиральную основу (L-аминокислоты в первичных полипептидных цепях и углеводов D-дезоксирибоза/рибоза в ДНК и РНК), спонтанно формируются иерархические структуры с изменяющимся масштабом и сменой типа симметрии, принципиальной особенностью которых является чередование знака хиральности. Отмечено чередование знака хиральности D–L–D–L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК для наиболее распространенной В-формы. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур подобна той, что мы наблюдаем для ДНК, но со сдвигом по фазе на 180° : L–D–L–D.

Подобный эффект описан нами и для искусственных модельных полимерных и жидкокристаллических систем, ранее не замеченный в неживой природе, где в естественных условиях гомохиральные системы практически не встречаются, поскольку не являются устойчивы-

ми вследствие известных процессов рацемизации [3, 4].

В развитие разрабатываемой концепции в данной работе внимание сфокусировано на переходе от макромолекул к надмолекулярным структурам (элементам цитоскелета внутри живой клетки — микрофиламентам, промежуточным филаментам и микротрубочкам). Высказывается гипотеза о том, что закономерность периодичности внутримолекулярных хиральных структур распространяется на надмолекулярный уровень — уровень цитоскелета.

ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНЫЕ И НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХИРАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ КЛЕТОК

Особый интерес представляет изменение знака хиральности на более высоких уровнях внутриклеточных структур, а именно в таких супрамолекулярных белковых конструкциях, как элементы цитоскелета. К ним относятся микрофиламенты, промежуточные филаменты и микротрубочки.

Микрофиламенты подстилают мембрану клетки, что придает ей механическую прочность. Благодаря способности образовывать различные пространственные конфигурации микрофиламенты участвуют в образовании ламеллоподий, филоподий, что необходимо для перемещения клетки в пространстве. Пучки микрофиламентов закоривают мембранные белки и формируют фокальные контакты. Микрофиламент сложен из мономеров глобулярного актина (G-актина). Далее G-актин выстраивается в одноцепочечную левую спираль с поворотом на -166° вокруг оси спирали [6]. Молекулы расположены на одной спирали с повторением через 13 молекул за почти ровно шесть левых поворотов. Повышение на молекулу составляет 2.76 нм, а закрутка на молекулу составляет $-166.6 \pm 0.6^\circ$ [7, 8]. Это четвертичная структура микрофиламента.

Наконец, две левозакрученные цепочки G-актина, свитые в правую спираль, образуют супрамолекулярную структуру — сам микрофиламент (также называемый F-актином) (рис. 1) [6].

Скрученные правым образом двойные спирали (микрофиламенты) ориентированы на взаимодействие с левыми фосфолипидами мембраны клетки эукариот, что подтверждает выдвинутую нами ранее гипотезу о взаимодействии между разнотипными молекулами с разным знаком хиральности (L с D или D с L) [5].

Промежуточные филаменты — следующий вид элементов цитоскелета — имеют каркасную функцию. Они пронизывают всю клетку от одной десмосомы до другой, придавая клетке механическую прочность. Отдельный вид промежуточных

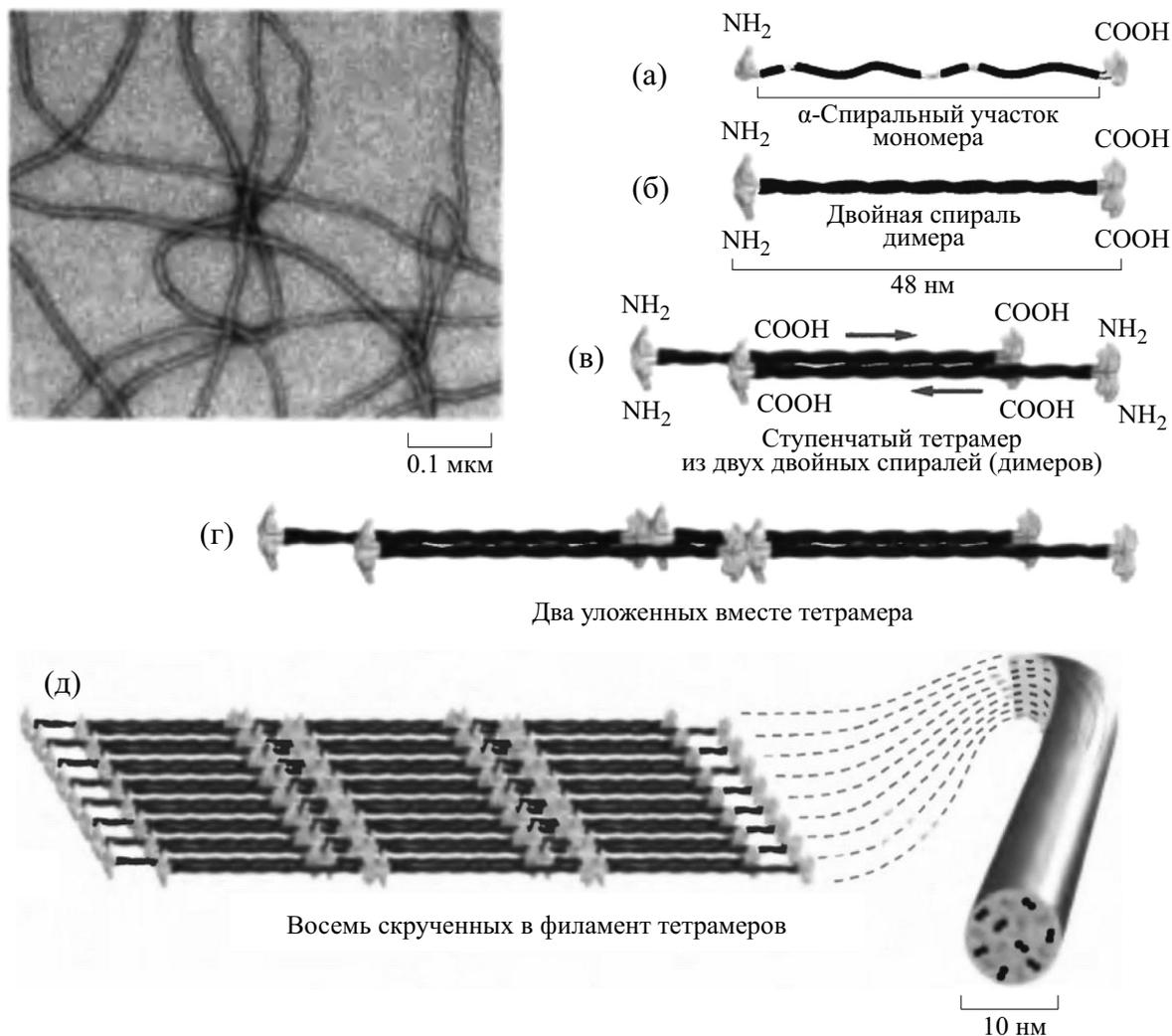


Рис. 2. Электронная микрофотография и модель сборки промежуточных филаментов (адаптировано из работы [13]).

филаментов – ядерная ламина – представляет собой сеть, подстилающую ядерную мембрану и влияющую на компактизацию хроматина. Промежуточный филамент имеет структуру, похожую на веревку, – суперспираль из 32-х протяженных правых α -спиралей в поперечном сечении филамента (рис. 2) [9].

Необходимо отметить, что на сегодняшний день окончательно не выяснено экспериментально относительное расположение этих 32 α -спиралей внутри промежуточного филамента. Разрабатываются различные модели его сборки [10]. Однако известно, что две α -спирали образуют левозакрученный димер по принципу «голова к голове, хвост к хвосту» [9, 11]. Два таких димера объединяются по принципу «голова к хвосту», образуя тетрамер, также называемый протофиламентом, причем скручиваются эти димеры друг относительно друга вправо, чтобы максимизировать площадь контакта [12]. Правозакрученный

тетрамер – четвертичный уровень структуры промежуточного филамента. Наконец, восемь тетрамеров собираются в промежуточный филамент, скручиваясь влево [13, 14], что соответствует супрамолекулярному структурному уровню.

У человека обнаружено около семидесяти различных видов промежуточных филаментов, отличающихся по расположению в клетке и по функциям, но очень сходных по строению, за исключением хвостовых доменов [9, 13]. Так, есть цитоплазматические промежуточные филаменты и ядерные. К цитоплазматическим промежуточным филаментам относятся следующие их типы: виментин-подобные, эпителиальные и аксональные промежуточные филаменты. Ядерные промежуточные филаменты – ламины – подстилают мембрану клеточного ядра. Левозакрученные ядерные промежуточные филаменты – ламины – ориентированы на взаимодействие с хромосом-

Взаиморасположение хиральных структур в системе филаментов цитоскелета эукариотов

Структурные уровни организации белка	Микрофиламент	Промежуточный филамент	Микротрубочка
I	Аминокислоты L	Аминокислоты L	Аминокислоты L
II	α -Спирали D	α -Спирали D	α -Спирали D
III	G-актин (глобула) ???	Суперспирали-димеры L	Мономер тубулина (α/β - тубулин) ???
IV	Одна нить из G-актина L	Тетрамеры-протофиламенты D	Гетеродимер тубулина (α - и β -тубулин) ???
Супрамолекулярная структура	Две нити из G-актина D	Веревкоподобный филамент из восьми тетрамеров L	Трехзаходная спираль L

ной ДНК (которая в расплетенном виде является правой двойной спиралью) [15, 16].

Микротрубочки на супрамолекулярном уровне своей структуры представляют собой трехзаходную левозакрученную спираль [17, 18]. Они направлены от ядра к периферии и необходимы для сравнительно быстрого направленного внутриклеточного транспорта, что критически важно в митозе при растаскивании хромосом к полюсам дочерних клеток. Левозакрученные микротрубочки, как мы полагаем, эволюционно «нацелены» на взаимодействие (хоть и опосредованное) с хромосомной ДНК при митозе [13].

В таблице нами систематизированы данные о знаке хиральности структурных уровней элементов цитоскелета.

Отдельные ячейки в таблице (как, например, для третичной структуры мономера тубулина) не содержат знака хиральности, характерного для этой структуры, поскольку оценка хиральности глобулы в настоящее время не представляется возможной из-за отсутствия универсальной меры хиральности подобных структур.

Таким образом, в работе отмечено чередование знака хиральности на более высоких, нежели внутримолекулярные, уровнях организации кле-

точных структур. Поскольку цитоскелет — это система, пронизывающая клетку, можно предположить, что хиральность его элементов служит направляющим мотивом для внутриклеточных взаимодействий между структурами, включающими молекулы различного типа хиральности. Обнаружено взаимодействие между разнотипными молекулами с разным знаком хиральности. Так, правозакрученные микрофиламенты ориентированы на взаимодействие с левыми фосфолипидами мембраны клетки. Левозакрученные ламинины и микротрубочки направлены на взаимодействие с ДНК — правыми двойными спиралью. Напомним, что при взаимодействии между однотипными макромолекулами на разных структурных уровнях, как мы предполагаем, сходство характеризуется одинаковым знаком хиральности (белок-белок — L, нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) — D) [5].

Ранее мы отмечали, что чередование знака хиральности прослеживается на надмолекулярных структурных уровнях комплексов актина, тропомиозина и миозина [5]. Фибриллярный белок тропомиозин представляет собой структуру типа coiled-coil, для которой характерно образование левозакрученной суперспирали из двух правозакрученных α -спиралей [19]. Тропомиозин взаимодействует только с F-актином, с G-актином взаимодействия нет [20]. Левая суперспираль тропомиозина наматывается на F-актин правым образом (рис. 3) [7]. Взаимодействие этих белков — яркий пример взаимодействия супрамолекулярных структур.

Хвосты миозина II на четвертичном уровне своей структуры образуют правозакрученную фибриллу, при этом на третичном уровне имея левозакрученное перекрытие α -спиралей. При

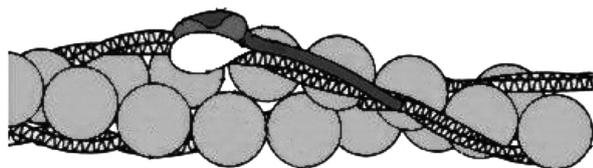


Рис. 3. Левая суперспираль тропомиозина наматывается на F-актин правым образом.

мышечном сокращении правозакрученная миофибрилла взаимодействует с правозакрученной актиновой фибриллой.

Образование знакопеременных хиральных иерархий в макромолекулярных структурах связано с существованием энергетической воронки в конфигурационном пространстве на поверхности потенциальной энергии со сложным ландшафтом, которая втягивает процесс сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию [3, 21]. Такая воронка, по-видимому, характеризуется семейством близко расположенных минимумов свободной энергии и задает направление траектории фолдинга, проходящей через цепочку таких локальных минимумов. Данный процесс обусловлен четкой физической причиной — стремлением системы понизить исходный уровень свободной энергии, образующийся при энергозависимом отборе гомохиральных мономеров первичных структур макромолекул из их рацемических смесей. Однако совершенно не очевидно, что система достигает своего глобального минимума, поскольку должна сохранять возможность реализации конформационных переходов, необходимых для функционирования макромолекул разного типа как молекулярных машин.

В живых клетках антиэнтропийная выборка левых аминокислот молекулами тРНК происходит с затратой энергии АТФ [22]. Из этого следует, что первичная структура белков — полипептидная цепь из остатков левых аминокислот — содержит распределенный запас свободной энергии. Поэтому можно полагать, что обнаруженные нами знакопеременные хиральные комплементарные друг к другу последовательности структурных уровней L–D–L–D для белков определяют траекторию, по которой направляется фолдинг макромолекул. Происходит процесс «вертикальной рацемизации».

Переключение знака хиральности на первичном, вторичном и третичном уровнях структуры белков обусловлено гомохиральностью элементов, составляющих эти уровни (L-аминокислоты, правые α -спирали, левые суперспирали) [3]. Эти структуры в процессах функционирования не претерпевают разборки, уровни функционируют как единое целое. На более высоких надмолекулярных структурных уровнях белков (на четвертичном и супрамолекулярном уровнях) процесс спонтанного формирования знакопеременных хиральных иерархий может продолжиться, что мы и наблюдаем. До этого момента внешние источники энергии не требуются. Однако эти сократительные структуры или структуры цитоскелета в процессе функционирования должны подвергаться разборке. Тут уже требуется энергия, которую поставляют для F-актина связанные при

полимеризации молекулы АТФ. Для разборки же тубулиновых микротрубочек используется ГТФ. У микрофиламентов молекула АТФ (или АДФ) связана с каждым мономером актина. У микротрубочек ГТФ/ГДФ являются частью димера тубулина (с мономером α -тубулина всегда связан ГТФ, с мономером β -тубулина — ГТФ, гидролизующийся в ГДФ) [13]. Существенно, что включение в названные системы негидролизующихся аналогов макроэргических соединений не препятствует их самосборке, но останавливает их разборку. Это прямое свидетельство того, что именно разборка или расслабление надмолекулярных структур является энергоакцепторным процессом.

В отличие от микрофиламентов и микротрубочек субъединицы промежуточных филаментов не включают в себя нуклеозидтрифосфаты. Их сборка на более высоких структурных уровнях сходна со сборкой на первичном, вторичном и третичном уровнях структуры: решающую роль играют латеральные контакты между спиралями различных уровней: правыми α -спиралями, затем левыми суперспиральными димерами, далее — правыми тетрамерами, образующими в итоге «веревкоподобную» структуру. Однако и здесь разборка связана с фосфорилированием при участии киназ [23].

В заключение мы хотели бы отметить, что введение представлений о хиральном дуализме в рассмотрение молекулярных и надмолекулярных структур клетки позволило увидеть их «тонкую структуру»: в дополнение к периодическим структурам каждого уровня спонтанно формируются вертикальные периодические структуры, причем сам процесс их формирования можно представить как процесс автоволновой самоорганизации в активных средах, где распределенный ресурс свободной энергии определяется гомохиральностью первичных структур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00082).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. A. Tverdislov, arXiv **1212**, 1677 (2012).
2. В. А. Твердислов, Биофизика **58** (1), 159 (2013).
3. В. А. Твердислов и Е. В. Малышко, Успехи физ. наук **189**, 375 (2019).
4. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко и С. А. Ильченко, Изв. РАН. Сер. физ. **79** (12), 1728 (2015).
5. В. А. Твердислов, Е. В. Малышко, С. А. Ильченко и др. Биофизика **62** (3), 421 (2017).
6. E. D. Korn, *Physiol. Rev.* **62** (2), 672 (1982).
7. R. A. Milligan, M. Whittaker, and D. Safer, *Nature* **348** (6298), 217 (1990).
8. R. Dominguez and K. C. Holmes, *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 169 (2011).
9. H. Herrmann and U. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **73** (1), 749 (2004).
10. N. S. Murthy, W. Wang, and Y. Kamath, *J. Struct. Biol.* **206** (3), 295 (2019).
11. F. H. C. Crick, *Acta Crystallographica* **6**, 689 (1953).
12. D. J. Bray, T. R. Walsh, M. G. Noro, et al., *PloS One* **10** (7), (2015).
13. Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др., *Молекулярная биология клетки* (НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, М. – Ижевск, 2013).
14. E. Fuchs and K. Weber, *Annu. Rev. Biochem.* **63** (1), 345 (1994).
15. L. E. Kapinos, P. Burkhard, H. Herrmann, et al., *J. Mol. Biol.* **408** (1), 135 (2011).
16. T. Dechat, S. A. Adam, P. Taimen, et al., *Cold Spring Harbor Perspectives Biol.* **2** (11), (2010).
17. L. A. Amos, A. Klug *J. Cell Sci.* **14** (3), 523 (1974).
18. D. Chrétien, J. M. Kenney, S. D. Fuller, et al., *Structure* **4** (9), 1031 (1996).
19. И. А. Невзоров и Д. И. Левицкий, Успехи биол. химии **51**, 283 (2011).
20. S. V. Perry, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22** (1), 5 (2001).
21. C. Levinthal, *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems Proc.* **67** (41), 22 (1969).
22. B. Lewin, et al., *Cells* (Jones & Bartlett Publ., London, 2007).
23. A. A. Hyman, S. Salser, D. N. Drechsel, et al. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1155 (1992).

Chirality as a Physical Basis of Hierarchical Periodization of Biomacromolecular Structures

E.V. Malyshko, A.R. Murtazina, and V.A. Tverdislov

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

A unified system of classification of levels of molecular structures of a living cell as the hierarchy of alternating-sign chiral structures that reflects a physical (thermodynamic/entropic) basis of intramolecular and supramolecular folding has been proposed and substantiated. The tendencies for intermolecular chiral correspondences characteristic of the interactions between macromolecules of the same and different types at the corresponding levels of molecular organization (protein–protein–L-L; nucleic acids–DNA–RNA–D-D; protein–nucleic acids L-D; proteins and nucleic acids with L-lipids of membranes – according to the sign of chirality of the corresponding level of organization of the structure of macromolecules) have been identified.

Keywords: chirality, enantiomers, proteins, cytoskeleton

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СВЯЗАННЫХ С АТОМАРНЫМИ КЛАСТЕРАМИ ПОЛИАМФОЛИТНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТЯХ МЕТАЛЛОПОДОБНЫХ НАНООБЪЕКТОВ

© 2020 г. Н.Ю. Кручинин, М.Г. Кучеренко

Центр лазерной и информационной биофизики Оренбургского государственного университета,
460018, Оренбург, просп. Победы, 13

E-mail: kruchinin_56@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2019 г.

После доработки 21.01.2020 г.

Принята к публикации 22.01.2020 г.

С использованием молекулярно-динамического моделирования были исследованы электрически индуцированные конформационные изменения полиамфолитных полипептидов, связанных с модельными металлическими атомарными кластерами, на поверхностях металлоподобных наночастицы и подложки с равномерным распределением электрического заряда, а также на поверхности поляризованной наночастицы. Рассчитаны средние расстояния между связанными с полипептидом атомарными кластерами и адсорбентом при изменении плотности заряда на его поверхности. Электрически индуцированные изменения конформаций полиамфолита приводили к значительному смещению атомарных кластеров, связанных с макроцепью, относительно адсорбирующей поверхности нанобъекта, что может быть использовано в сенсорах на основе эффектов поверхностного плазмонного резонанса и гигантского комбинационного рассеяния, а также в нанозондах с регулируемыми или переключаемыми под воздействием электрического поля параметрами.

Ключевые слова: молекулярная динамика, полиамфолитные полипептиды, атомарные кластеры, наночастицы, адсорбция, электрически индуцированные конформационные изменения.

DOI: 10.31857/S0006302920020027

В современных биомедицинских исследованиях, а также при разработке различных химических сенсоров, таких как сенсоры на основе эффектов поверхностного плазмонного резонанса или гигантского комбинационного рассеяния, широко используются пробиологические наноструктуры, в которых конформации адсорбированных на поверхностях нанобъектов полипептидных цепей, связанных с золотыми наночастицами, могут изменяться под различными внешними воздействиями [1–9]. В качестве нанобъектов могут выступать как плоские металлические или полупроводниковые поверхности, так и цилиндрические или сферические объекты нанометрового радиуса, такие как наностержни, наночастицы и квантовые точки, которые могут располагаться на подложке, образуя наноструктурированную поверхность. С целью усиления сигнала и повышения чувствительности сенсоров на основе эффектов поверхностного плазмонного резонанса и гигантского комбинационного

рассеяния полимерные молекулы, адсорбированные на золотой подложке, часто связывают с наночастицами золота [1–9]. Также подобные гибридные нанобъекты могут быть использованы в качестве нанозондов с перестраиваемыми характеристиками в биохимических и биофизических исследованиях. Поэтому перспективным для создания новых чувствительных элементов приборов является разработка методов управления изменениями конформаций полимерных цепей под воздействием статического электрического поля [10, 11], а также электромагнитного излучения.

На конформационную структуру адсорбированных макромолекулярных цепей существенное влияние оказывает форма адсорбента [12–15]. При этом в гибридных наносистемах, чувствительных к воздействию электрического поля, удобным является использование полиамфолитных макроцепей [15]. Если наносистему, в которой полиамфолитная макроцепь адсорбирована на твердой поверхности, поместить во внешнее электрическое поле, то конформационная струк-

Сокращение: МД – молекулярная динамика.

тура макромолекулы изменится в зависимости от направления и величины вектора напряженности поля. В том случае, если с полимерной цепью будет связана какая-либо молекула (например, молекула красителя) или атомарный кластер небольшого размера, то при перестройке конформационной структуры макроцепи расположение таких атомарных групп также будет изменяться.

Если металлический нанобъект находится во внешнем электрическом поле, то на его поверхности индуцируются электрические заряды и происходит его поляризация, а электрическое поле вокруг нанобъекта сильно искажается. На поверхности сферической наночастицы заряды распределяются с поверхностной плотностью, пропорциональной косинусу угла направлением вектора электрического поля и нормали к поверхности наночастицы. В случае размещения полиамфолитной макромолекулы на поверхности поляризованной металлической наночастицы подобное распределение индуцированных зарядов будет оказывать существенное влияние на ее конформационную структуру. Если воздействовать на гибридную наносистему такого типа электромагнитным излучением, то при низкой частоте изменения электрического поля конформационная структура адсорбированной макроцепи будет успевать перестраиваться вслед за вариациями электрического поля.

Такие электрически индуцированные изменения конформационной структуры связанных с кластерами золота полиамфолитных макроцепей приведут к появлению новых условий в сенсорах на основе эффектов поверхностного плазмонного резонанса и гигантского комбинационного рассеяния, а также других сенсорах, действие которых основано на использовании ферстеровского переноса энергии между связанными макроцепью нанобъектами. Это может быть полезным при создании сенсоров и нанозондов нового поколения с улучшенными характеристиками, перестраиваемыми под воздействием электрического поля.

Поэтому целью данной работы является исследование характера расположения и конформационной мобильности связанных с атомарными кластерами полиамфолитных полипептидов на поверхности однородно заряженных и поляризованных нанобъектов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Было произведено молекулярно-динамическое (МД) моделирование полиамфолитных полипептидов с разными законами распределения положительных и отрицательных аминокислотных остатков размером от 100 до 400 звеньев на

поверхностях металлоподобных подложки и наночастицы.

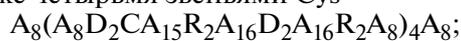
Полиамфолитные полипептиды состояли из аминокислотных остатков Ala (A) с равномерно распределенными положительно заряженными звеньями Arg (R) и отрицательными Asp (D), а также от одного до пяти звеньев Cys (C), каждое из которых могло быть ковалентно связано с модельным металлическим кластером из 32 или 80 атомов. Аминокислотный остаток Cys вместе со связанным с ним атомарным кластером располагался около заряженного звена, обычно у остатка Asp. МД-моделирование было произведено как для связанных с атомарными кластерами полипептидов, так и без них.

На поверхности металлоподобной наночастицы проводили МД-моделирование со следующими полипептидами:

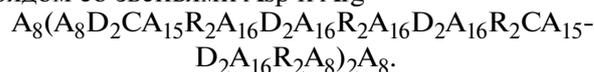
1) полипептид A315R40D40C5, состоящий из 400 аминокислотных остатков с 315 звеньями Ala с равномерно распределенными 20 парами звеньев Asp и 20 парами звеньев Arg, а также пятью звеньями Cys –



2) полипептид A268R16D16C4_1, состоящий из 304 аминокислотных остатков с 268 звеньями Ala с равномерно распределенными восемью парами звеньев Asp и восемью парами звеньев Arg, а также четырьмя звеньями Cys –



3) полипептид A268R16D16C4_2, состоящий из 304 аминокислотных остатков с 268 звеньями Ala с равномерно распределенными восемью парами звеньев Asp и восемью парами звеньев Arg, а также четырьмя звеньями Cys, расположенными рядом со звеньями Asp и Arg –



Были рассмотрены следующие полипептиды из 100 аминокислотных остатков, адсорбированные на металлоподобной подложке:

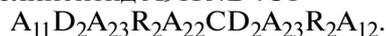
1) полипептид A89R5D5C1 –



2) полипептид A79R10D10C1 –



3) полипептид A91R4D4C1 –



Модель металлоподобной наночастицы была получена путем вырезания шара радиусом 1.5 нм из модельного кристалла золота (гранцентрированная кубическая решетка). Модель металлоподобной подложки также была построена из модельного кристалла золота со сторонами 14 нм и толщиной в две элементарные ячейки, при этом полипептид располагался на ней вблизи кристаллографической поверхности Au(001). Модели ме-

таллических кластеров из 32 и 80 атомов были построены согласно работе [16], в которой они были получены методом Монте-Карло из атомов золота. Атомы наночастицы и подложки в процессе моделирования оставались зафиксированными.

МД-моделирование проводили с использованием программного комплекса NAMD 2.12-2.13 [17]. Для полипептидов было использовано силовое поле CHARMM22 [18]. Взаимодействия полипептидов с металлоподобными подложкой и наночастицей описывали потенциалом Леннарда-Джонса, разработанным в работе для атомов золота [19]: глубина потенциальной ямы для атома золота задавалась равной -5.29 ккал/моль, а минимум потенциала находился на расстоянии 2.951 Å. Взаимодействие связанных аминокислотного остатка Cys полипептида и модельного металлического кластера описывалось потенциалами, разработанными в работе [20] для связанного атома серы аминокислотного остатка Cys с атомом золота металлической подложки: для гармонического потенциала валентной связи Au-S равновесное расстояние было равно 2.531 Å, константу жесткости связи задавали равной 198 ккал/(моль·Å²); для связи S-C данные параметры были равны 1.836 Å и 205 ккал/(моль·Å²) соответственно. Валентный угол Au-S-C имел равновесное значение 109° , а коэффициент жесткости в гармоническом потенциале валентного угла был равен 46.347 ккал/моль [20]. Потенциал двугранного угла Au-S-C-C имел следующие параметры: сдвиг фазы 180° , константа жесткости 0.31 ккал/моль, кратность торсионного барьера равна двум; для угла S-C-C-C данные параметры были равны соответственно -19° , 0.22 ккал/моль и 2 [20]. Потенциал Ван-дер-Ваальса обрезали на расстоянии 1.2 нм с помощью функции сглаживания между 1.0 и 1.2 нм. Электростатические взаимодействия рассчитывали непосредственно на расстоянии 1.2 нм, для больших дистанций использовали метод «частица-сетка» Эвальда [21] с шагом сетки 0.11 нм. Вся молекулярная система была помещена в куб с ребрами до 24 нм, заполненный молекулами воды TIP3P [22].

В начальный момент времени макромолекула полипептида располагалась в виде неравновесного клубка рядом с незаряженной поверхностью металлоподобной наночастицы или подложки. Были рассмотрены три разных стартовых клубка для каждого полипептида. По результатам МД-моделирования были получены по три равновесные конформационные структуры для каждого рассмотренного полипептида, которые впоследствии были использованы в качестве стартовых конфигураций для МД-моделирования на заряженной поверхности. МД-моделирование проводили при постоянной температуре (термостат Бе-

рендсена) 300 К, а также при 900 К с последующим снижением до 300 К. Это позволяло достигать более глубоких минимумов конформационной энергии макроцепи, в том числе на более коротком участке траектории. Длина временной траектории достигала 15 нс. Для контроля получения равновесных конформаций осуществляли наблюдение за изменением среднеквадратичного расстояния между атомами полипептида в различных конформациях.

Поверхности металлоподобных подложки и наночастицы заряжали путем присваивания парциальных зарядов их атомам, расположенным на поверхности [23]. Были получены следующие значения поверхностной плотности заряда подложки (нижний индекс означает парциальный заряд одного атома на поверхности): $\sigma_{\pm 0.05}^p = \pm 1.24e/\text{нм}^2$, $\sigma_{\pm 0.1}^p = \pm 2.48e/\text{нм}^2$, $\sigma_{\pm 0.15}^p = \pm 3.72e/\text{нм}^2$. Были рассмотрены два варианта распределения заряда на поверхности наночастицы: случай с равномерным сферически симметричным распределением зарядов на поверхности наночастицы и случай однородной поляризации наночастицы. Получены следующие значения поверхностной плотности заряда однородно заряженной наночастицы: $\sigma_{\pm 0.1}^n = \pm 2e/\text{нм}^2$, $\sigma_{\pm 0.2}^n = \pm 4e/\text{нм}^2$, $\sigma_{\pm 0.3}^n = \pm 6e/\text{нм}^2$. Локальное электрическое поле поляризованной наночастицы задавали через изменение зарядов атомов на ее поверхности по закону косинуса. Были получены следующие значения индуцированного дипольного момента наночастицы: $p_{0.25} = 2.73$ кД, $p_{0.50} = 5.46$ кД, $p_{1.00} = 10.92$ кД и $p_{1.50} = 16.38$ кД. При этих значениях дипольного момента атомы на положительном полюсе наночастицы имели парциальные заряды $+0.25e$, $+0.5e$, $+1e$ и $+1.5e$ соответственно.

По результатам МД-моделирования на конечном стационарном участке траектории по всем полученным конформациям при различных вариантах распределения заряда на поверхности наночастицы рассчитывали радиальные распределения средней плотности атомов полипептида с дифференциацией по типам звеньев, зависимости средних угловых распределений атомов полипептида на поверхности поляризованной наночастицы, а на поверхности подложки рассчитывались «высотные» распределения средней плотности атомов полипептида. Также были рассчитаны расстояния между центрами атомарных кластеров, связанных с полипептидом, и центром наночастицы или поверхностью подложки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

МД-моделирование связанных с модельным металлическим атомарным кластером полиамфолит-

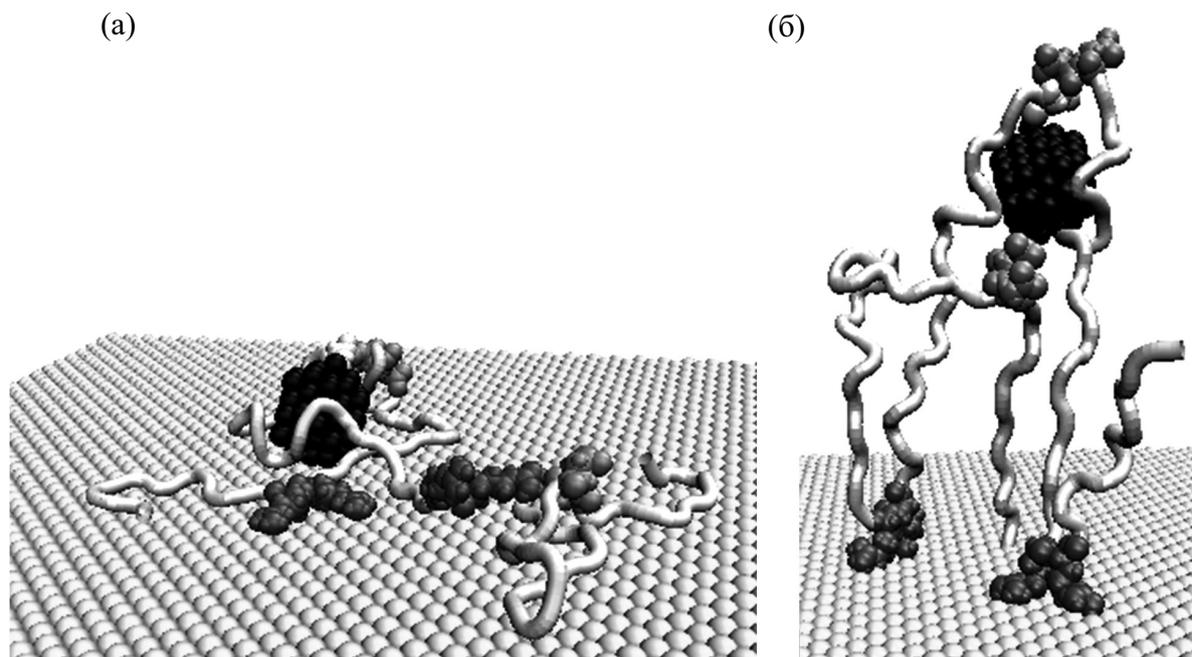


Рис. 1. Полипептид A91R4D4C1 с модельным металлическим кластером из 80 атомов на нейтральной (а) и отрицательно заряженной с поверхностной плотностью заряда $\sigma_{-0,15}^p$ (б) поверхности металлоподобной подложки после МД-моделирования (светло-серая трубка – звенья Ala, черным цветом изображен атомарный кластер, темно-серым – звенья Arg, а светло-серым – Asp).

ных полипептидов на поверхности плоской металлоподобной подложки. При МД-моделировании полипептидов длиной 100 звеньев как с атомарным кластером, так и без него на нейтральной металлоподобной подложке происходила адсорбция аминокислотных остатков полипептида вне зависимости от их типа (рис. 1а). При этом атомарный кластер находился в цепи полипептида на небольшом расстоянии от подложки. Наличие небольшого атомарного кластера оказывало слабое влияние на конформационную структуру адсорбированной макроцепи. В этом случае формировались характерные «высотные» распределения плотности атомов полипептида, которые хорошо аппроксимируются экспоненциальной кривой [24]. Параметры аппроксимирующих экспоненциальных кривых распределений средних «высотных» плотностей атомов полипептида в случаях, когда полипептид был связан с небольшим атомарным кластером, так и без него, отличались незначительно. При МД-моделировании на нейтральной подложке центр кластера вне зависимости от его размера находился в среднем на расстоянии около 1 нм от ее поверхности.

При увеличении абсолютной величины поверхностной плотности заряда наблюдалась значительная перестройка конформационной структуры адсорбированного полипептида как при МД-моделировании вместе с кластером (рис. 1б), так и без него: все большее количество остатков, имеющих

знак заряда, одинаковый с подложкой, отдалялись от нее, а остатки с противоположным знаком располагались на поверхности. При достижении значений поверхностной плотности $\sigma_{-0,15}^p$ для полипептидов A89R5D5C1 и A91R4D4C1, а для полипептида A79R10D10C1 при $\sigma_{-0,1}^p$ все звенья, имеющие знак заряда, одинаковый с подложкой, отдалялись на максимально возможное расстояние от подложки, а все звенья с противоположным знаком заряда располагались на подложке (рис. 1б). Отличие для полипептида A79R10D10C1 связано с большей плотностью заряженных звеньев в макроцепи. При этом расстояние, на которое удалялись одноименно заряженные звенья, зависело от первичной структуры макроцепи и определялось расстоянием между разноименно заряженными звеньями полипептида. Так как кластер был связан с остатком Cys, который находился рядом с отрицательно заряженным аминокислотным остатком Asp, то при изменении заряда подложки он смещался вслед за смещением остатка Asp, поэтому на отрицательно заряженной поверхности кластер отдалялся от нее (рис. 1б).

Максимальное смещение атомарного кластера для полипептидов A89R5D5C1 и A91R4D4C1 наблюдалось при поверхностной плотности заряда подложки $\sigma_{-0,15}^p$: расстояние от центра кластера до подложки в среднем было 3 нм и 5.2 нм соответ-

ственно (рис. 16). Для полипептида A79R10D10C1 максимальное смещение кластера происходило при $\sigma_{-0,1}^p$, при этом расстояние от центра кластера до подложки составляло в среднем 2.5 нм. На положительно заряженной подложке наблюдалось меньшее смещение кластера: для полипептидов A89R5D5C1 и A91R4D4C1 при $\sigma_{+0,15}^p$ среднее расстояние от центра кластера до подложки было 1.5 нм и 1.8 нм соответственно, а для полипептида A79R10D10C1 при $\sigma_{+0,1}^p$ оно в среднем было 1.6 нм. Такое смещение кластера от поверхности связано с вытягиванием цепи в направлении нормали от подложки и, соответственно, смещением остатка Cys вместе с кластером в вертикальном направлении. Также такое поведение связано с тем, что положительный заряд Arg звена и отрицательный Asp звена сосредоточены на конце R-группы аминокислотного остатка, поэтому такие аминокислотные остатки касаются заряженной подложки концом R-группы, при этом вытягиваясь перпендикулярно поверхности.

МД-моделирование связанных с модельными металлическими атомарными кластерами полиамфолитных полипептидов на поверхности металлоподобной наночастицы с равномерным сферически симметричным распределением зарядов. В случае МД-моделирования полипептидов, связанных с несколькими кластерами, состоящими из 32 атомов, на поверхности незаряженной сферической металлоподобной наночастицы наблюдалась адсорбция большинства аминокислотных остатков вне зависимости от их типа, при этом рассмотренные полипептиды полностью обволакивали наночастицу (рис. 2а). Характер радиальных распределений средней плотности атомов полипептида (рис. 3а) на незаряженной наночастице был схож с полученными в работе [15] результатами. Атомарные кластеры для всех рассмотренных полипептидов в среднем находились на расстоянии 2 нм от центра незаряженной наночастицы.

В случае МД-моделирования полипептидов A315R40D40C5 и A268R16D16C4_1 (рис. 2б и 2в) на поверхности наночастицы с равномерным сферически симметричным распределением зарядов происходила перестройка конформационной структуры полипептида, связанного с атомарными кластерами, схожая со случаем МД-моделирования на плоской заряженной поверхности. В полипептидах A315R40D40C5 и A268R16D16C4_1 кластеры были связаны с аминокислотными остатками Cys, которые располагались около отрицательно заряженных звеньев Asp. Поэтому на отрицательно заряженной наночастице кластеры отдалялись от поверхности наночастицы вместе со звеньями Asp по мере увеличения поверхностной плотности заряда на наночастице, максимально отдаляясь при $\sigma_{-0,3}^n$

(рис. 2б). На рис. 2б видно, что кластеры, связанные с полипептидом A268R16D16C4_1, находятся на значительном расстоянии от наночастицы. На рис. 3б изображено радиальное распределение средней плотности атомов полипептида A268R16D16C4_1, полученное по результатам МД-моделирования с поверхностной плотностью заряда $\sigma_{-0,3}^n$. Из данного распределения видно, что все остатки Arg находятся у поверхности отрицательно заряженной наночастицы, остатки Asp максимально отдалены, а остатки Ala находятся между ними. Среднее расстояние атомарных кластеров от центра отрицательно заряженной наночастицы по мере изменения поверхностной плотности заряда для полипептида A268R16D16C4_1 составило при $\sigma_{-0,1}^n$ – 2 нм, при $\sigma_{-0,2}^n$ – 3.2 нм, а при $\sigma_{-0,3}^n$ – 4.5 нм. Для полипептида A315R40D40C5 данные расстояния равнялись при $\sigma_{-0,1}^n$ – 2 нм, при $\sigma_{-0,2}^n$ – 2.6 нм, а при $\sigma_{-0,3}^n$ – 3.5 нм. Различие удаленностей атомарных кластеров от наночастицы для полипептидов A315R40D40C5 и A268R16D16C4_1 связано с разным расстоянием между звеньями Asp и Arg в макроцепи.

При МД-моделировании полипептидов A315R40D40C5 и A268R16D16C4 на наночастице с равномерным сферически симметричным распределением положительных зарядов наблюдалась зеркально симметричная картина по отношению к случаю отрицательно заряженной наночастицы: звенья Asp находились у поверхности наночастицы, а звенья Arg были отдалены от нее (рис. 2в), что также видно из радиального распределения средней плотности атомов полипептида (рис. 3в). Кластеры, связанные с полипептидом, также отделились от поверхности наночастицы по сравнению со случаем незаряженной наночастицы (рис. 2в). Это связано с вытягиванием петель макроцепи вдоль нормали от поверхности наночастицы. Среднее расстояние атомарных кластеров от центра положительно заряженной наночастицы по мере изменения поверхностной плотности заряда для полипептида A268R16D16C4_1 составило при $\sigma_{+0,1}^n$ – 2 нм, при $\sigma_{+0,2}^n$ – 2.2 нм, а при $\sigma_{+0,3}^n$ – 3 нм. Для полипептида A315R40D40C5 данные расстояния были равны при $\sigma_{+0,1}^n$ – 2 нм, при $\sigma_{+0,2}^n$ – 2.5 нм, а при $\sigma_{+0,3}^n$ – 3 нм. Схожие значения расстояния модельных металлических кластеров от центра положительно заряженной наночастицы для полипептидов A315R40D40C5 и A268R16D16C4_1 связаны с одинаковым расположением кластеров у остатка Asp и не зависят от расстояния между звеньями Asp и Arg в макроцепи, а обусловлены лишь разной степенью вытягивания петель макроцепи в

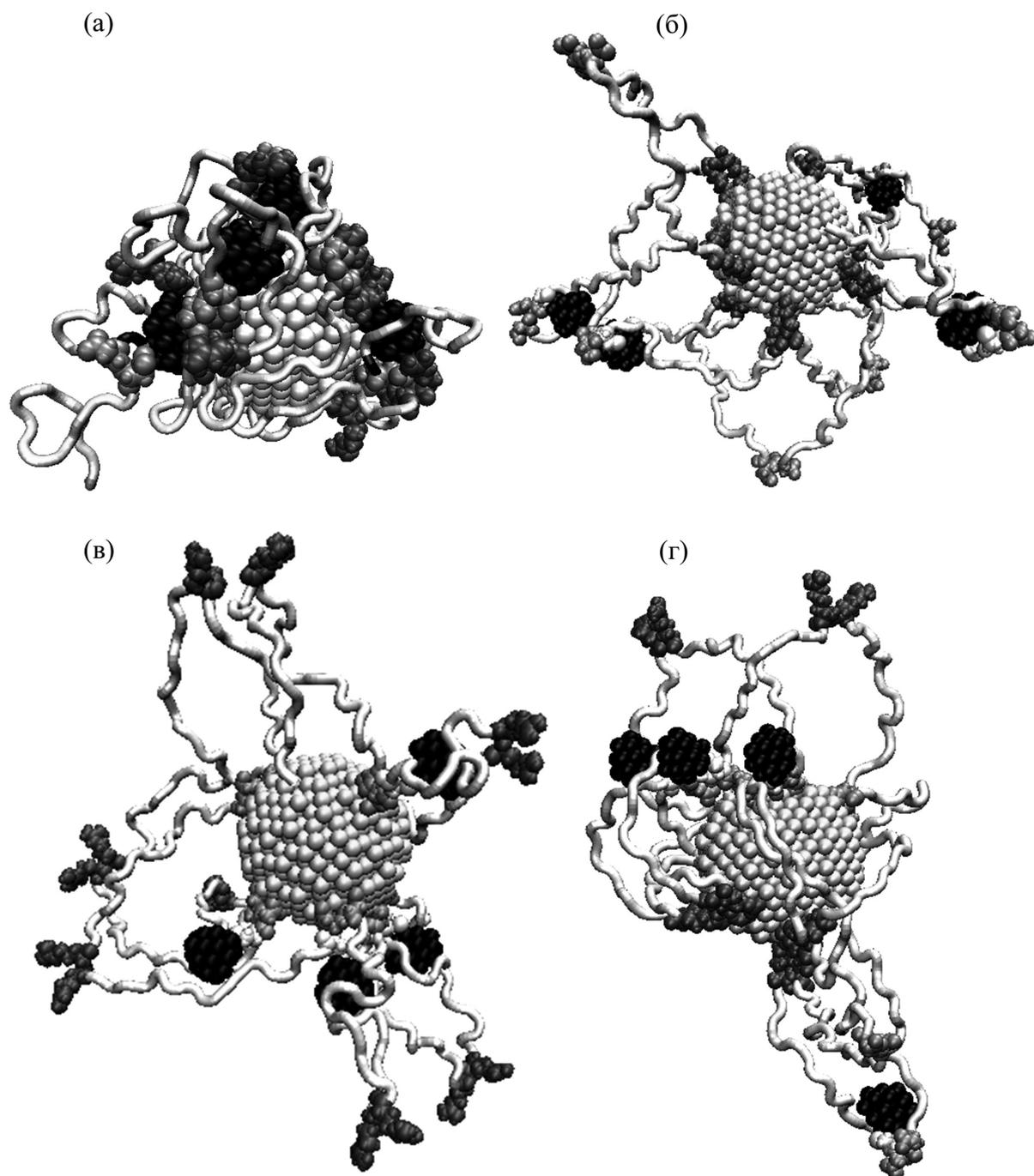


Рис. 2. Полипептид A268R16D16C4_1 с четырьмя модельными металлическими кластерами из 32 атомов на незаряженной (а), отрицательно (б) и положительно (в) заряженной с поверхностной плотностью заряда $\sigma_{-0.3}^n$ и $\sigma_{+0.3}^n$ соответственно, а также поляризованной (г) в вертикальном направлении (вверху положительный полюс, внизу – отрицательный) с дипольным моментом $p_{1.50}$ металлообразной наночастице после МД-моделирования (светло-серая трубка – звенья Ala, черным цветом изображены атомарные кластеры, темно-серым – звенья Arg, а светло-серым – Asp).

зависимости от величины заряженности поверхности наночастицы.

МД-моделирование связанных с модельными металлическими атомарными кластерами полиамфолитных полипептидов на поверхности поляризо-

ванной металлоподобной наночастицы. Для полипептидов A315R40D40C5, A268R16D16C4_1 и A268R16D16C4_2 было произведено МД-моделирование на поверхности поляризованной наночастицы. На рис. 2г видно, что на поверхности по-

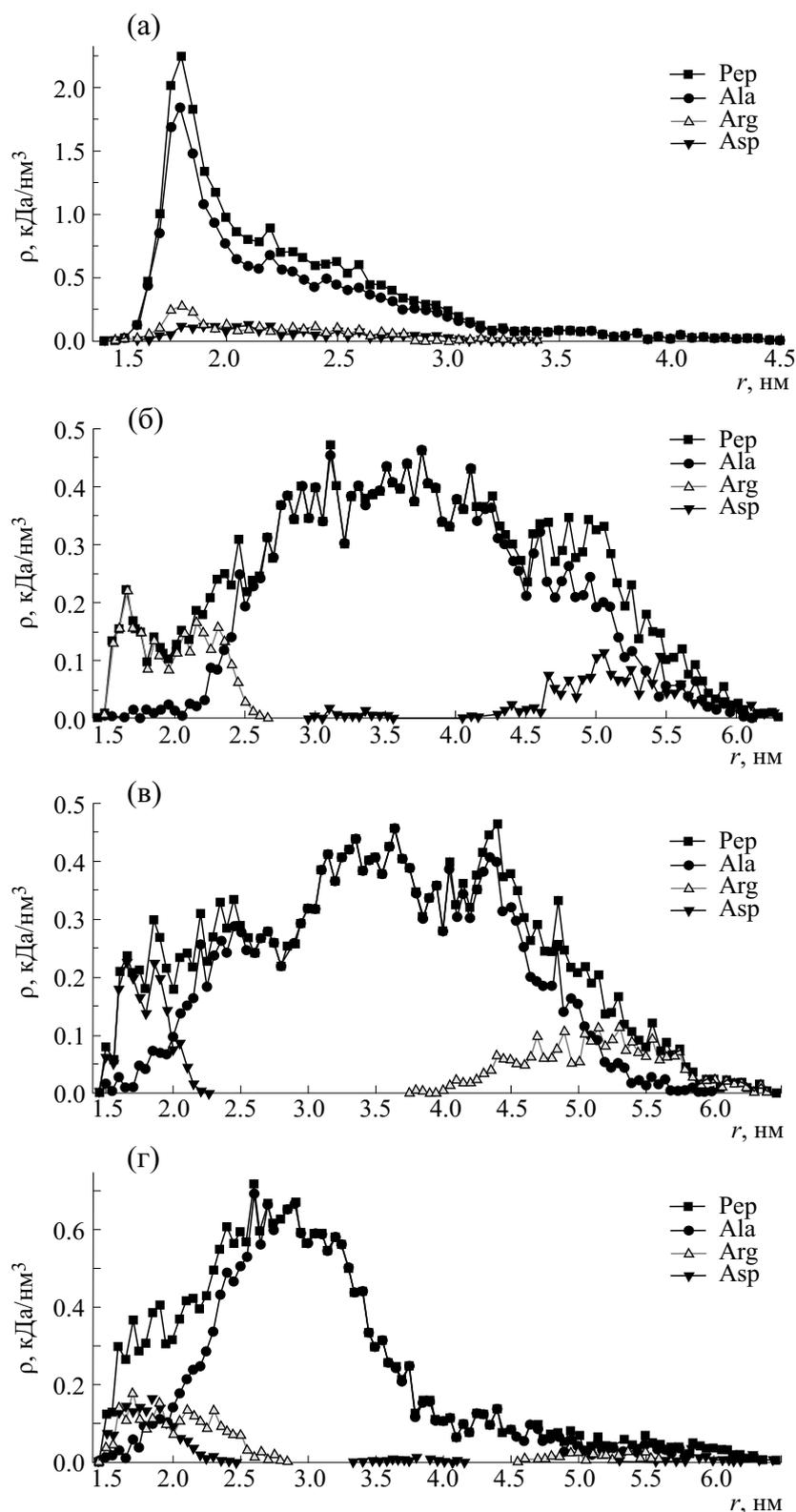


Рис. 3. Радиальные зависимости средней плотности атомов полипептида A268R16D16C4_1 на незаряженной (а), отрицательно (б) и положительно (в) заряженной с поверхностной плотностью заряда $\sigma_{-0.3}^n$ и $\sigma_{+0.3}^n$ соответственно, а также поляризованной (г) с дипольным моментом $p_{1.50}$ металлоподобной наночастице с дифференциацией по типам звеньев. На рисунке: Pep – зависимость средней плотности по всем атомам полипептида; Ala, Arg и Asp – усредненные плотности по типам аминокислотных остатков.

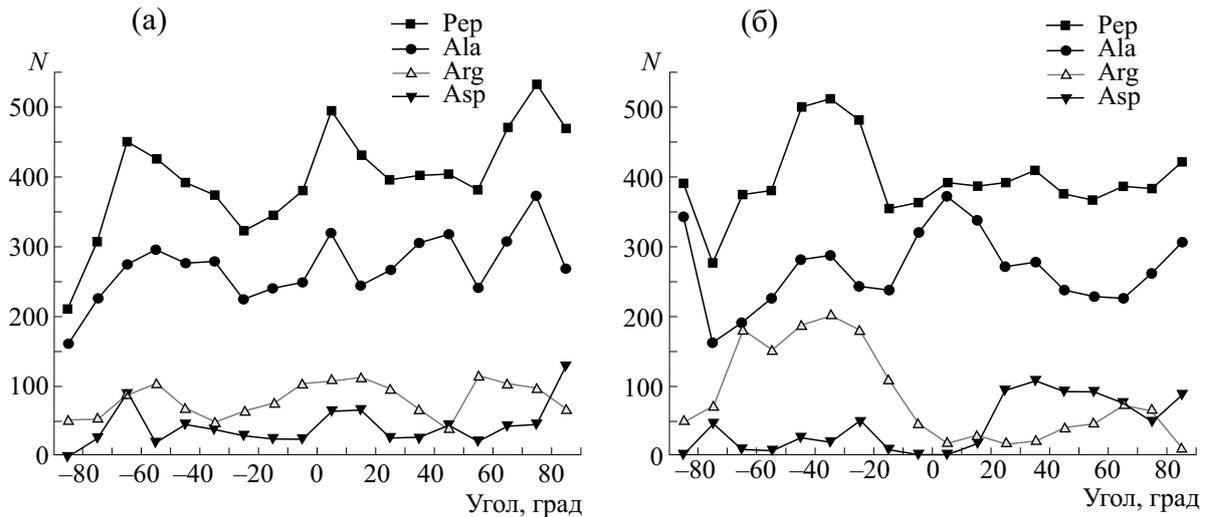


Рис. 4. Зависимости средних угловых распределений атомов полипептида A315R40D40C5 на незаряженной (а) и поляризованной (б) с дипольным моментом $p_{1.50}$ металлоподобной наночастице с дифференциацией по типам звеньев. На рисунке: Pep – усредненное угловое распределение по всем атомам полипептида; Ala, Arg и Asp – усредненные угловые распределения по типам аминокислотных остатков.

ляризованной наночастицы (вверху положительный полюс, внизу – отрицательный) произошла перестройка конформационной структуры полипептида A268R16D16C4_1, которая значительно отличается как от случая незаряженной наночастицы (рис. 2а), так и от случая с равномерным сферически симметричным распределением зарядов на поверхности наночастицы (рис. 2б и 2в). Видно, что часть положительно заряженных звеньев Arg сместилась к отрицательному полюсу наночастицы, а часть отрицательно заряженных звеньев Asp – к положительному полюсу. Также наблюдается вытягивание «опушки» макроцепи в районе полюсов из-за отталкивания одноименно заряженных полюсов наночастицы аминокислотных остатков (рис. 2г) и их смещением вдоль направления дипольного момента наночастицы.

Радиальное распределение средней плотности атомов полипептида на поверхности поляризованной наночастицы также значительно отличается от рассмотренных выше случаев. Из рис. 3г видно, что максимумы радиального распределения средней плотности заряженных аминокислотных остатков Arg и Asp полипептида A268R16D16C4_1 находятся у поверхности наночастицы, а профиль радиального распределения средней плотности звеньев Ala смещен от поверхности.

На рис. 4 изображены зависимости средних угловых распределений атомов полипептида A315R40D40C5 на незаряженной (рис. 4а) и поляризованной (рис. 4б) наночастице: по оси абсцисс отложены средние значения углов сферического сегмента, ограниченному окружностями

разных широт, начиная от отрицательно заряженного полюса (-90°) до положительного полюса (90°) наночастицы. Зависимости угловых распределений атомов адсорбированного полипептида были нормированы на амплитудные значения концентрации атомов в экваториальной области с учетом различий площади поверхности сферических сегментов, ограниченных окружностями различного радиуса. Видно, что на поляризованной наночастице произошло перераспределение аминокислотных остатков Arg в отрицательно заряженное полушарие, а звенья Asp сместились в положительно заряженную область наночастицы.

Среднее расстояние атомарных кластеров от центра поляризованной наночастицы по мере увеличения дипольного момента наночастицы для полипептида A315R40D40C5 составило при $p_{0.25}$ – 2.1 нм, при $p_{0.50}$ – 2.4 нм, при $p_{1.00}$ – 2.9 нм, а при $p_{1.50}$ – 3.2 нм. Для полипептида A268R16D16C4_1 данные расстояния были равны при $p_{0.25}$ – 2 нм, при $p_{0.50}$ – 2.4 нм, при $p_{1.00}$ – 3.1 нм, а при $p_{1.50}$ – 3.3 нм, а для полипептида A268R16D16C4_2 при $p_{0.25}$ – 2 нм, при $p_{0.50}$ – 2.3 нм, при $p_{1.00}$ – 2.9 нм, а при $p_{1.50}$ – 3.2 нм.

Таким образом, при МД-моделировании на поляризованной наночастице среднее расстояние связанных с макроцепью модельных металлических кластеров почти не меняется при различном расстоянии между положительными и отрицательно заряженными звеньями в макроцепи (полипептиды A315R40D40C5 и A268R16D16C4_1), а также в том

случае, если кластеры находятся рядом у звеньев разного знака (как Asp, так и Arg) полимерной цепи (полипептид A268R16D16C4_2).

ВЫВОДЫ

Под воздействием электрического поля распределенных электрических зарядов на поверхности нанообъектов конформационная структура полиамфолитных полипептидов, связанных с небольшими атомарными кластерами, существенно изменяется. Связанные с макроцепью небольшие атомарные кластеры смещаются относительно адсорбирующей поверхности вслед за электрически индуцированными конформационными изменениями полиамфолитной макромолекулы. Расстояние, на которое кластеры смещаются от заряженной поверхности, зависит от закона распределения заряженных аминокислотных остатков в макроцепи. Это расстояние достигает максимального значения в случае однородного распределения зарядов на подложке или наночастицы, когда все звенья макроцепи, заряженные одноименно по отношению к заряженной поверхности, максимально отдалены от нее, а атомарные кластеры при этом связаны с макроцепью рядом с этими звеньями. В случае поляризованной наночастицы наблюдается характерное вытягивание «опушки» полиамфолитной макроцепи в районе заряженных полюсов, а вместе с ней и смещение атомарных кластеров.

Таким образом, воздействием электрического поля можно управлять расстоянием между атомарными кластерами, связанными с полиамфолитной цепью, и адсорбирующей поверхностью металлоподобного нанообъекта. Такой эффект может быть использован при создании сенсоров нового поколения на основе эффектов поверхностного плазмонного резонанса и гигантского комбинационного рассеяния, а также в нанозондах с регулируемыми или переключаемыми под воздействием электрического поля параметрами, что может найти применение в биофизических и биохимических исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Оренбургской области в рамках научного проекта № 19-43-560003.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Lee, K. Chung, J. Lee, et al., *Adv. Funct. Mater.* **25**, 6716 (2015).
2. A. R. Ferhan and D. Kim, *Nano Today* **11**, 415 (2016).
3. H. Chen, Y. Wang, X. Li, et al., *RSC Adv.* **8**, 22177 (2018).
4. H. Chen, T. You, G. Xu, et al., *Sci. China Mater.* **61** (9), 1201 (2018).
5. A. Zengin, U. Tamer, and T. Caykara, *J. Colloid Interface Sci.* **448**, 215 (2015).
6. D. Li, Y. Ma, H. Duan, et al., *Biosens. Bioelectron.* **99**, 389 (2018).
7. X. Zhu, J. Li, H. He, et al., *Biosens. Bioelectron.* **74**, 113 (2015).
8. E. Chang, J. S. Miller, J. Sun, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334** (4), 1317 (2005).
9. S. Hamd-Ghadareh, A. Salimi, F. Fathi, S. Bahrami, *Biosens. Bioelectron.* **96**, 308 (2017).
10. Y. Chen, E. R. Cruz-Chu, J. C. Woodard, et al., *ACS Nano* **6** (10), 8847 (2012).
11. E. Cantini, X. Wang, P. Koelsch, et al., *Acc. Chem. Res.* **49** (6), 1223 (2016).
12. M. G. Kucherenko, A. P. Rusinov, T. M. Chmereva, et al., *Optics and Spectroscopy* **107**, 480 (2009).
13. M. G. Kucherenko, S. V. Izmodenova, N. Yu. Kruchinin, and T. M. Chmereva, *High Energy Chemistry* **43** (7), 592 (2009).
14. M. G. Kucherenko, V. N. Stepanov, and N. Yu. Kruchinin, *Optics and Spectroscopy* **118** (1), 103 (2015).
15. N. Yu. Kruchinin and M. G. Kucherenko, *Colloid J.* **81** (2), 110 (2019).
16. J. P. K. Doye and D. J. Wales, *New J. Chem.* **22**, 733 (1998).
17. J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, et al., *J. Comput. Chem.* **26** (16), 1781 (2005).
18. A. D. MacKerell, Jr., D. Bashford, M. Bellott, et al., *J. Phys. Chem. B* **102** (18), 3586 (1998).
19. H. Heinz, R. A. Vaia, B. L. Farmer, and R. R. Naik, *J. Phys. Chem. C* **112** (44), 17281 (2008).
20. A. R. Bizzarri, G. Costantini, and S. Cannistraro, *Biophys. Chem.* **106** (2), 111 (2003).
21. T. Darden, D. York, and L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* **98**, 10089 (1993).
22. W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, et al., *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
23. M. Shankla and A. Aksimentiev, *Nat. Commun.* **5**, 5171 (2014).
24. А. Ю. Гросберг и А. Р. Хохлов, *Статистическая физика макромолекул* (Наука, М., 1989).

Molecular Dynamics Simulation Polyampholyte Polypeptides Associated with Atomic Clusters on the Surfaces of Metal-Like Nanoobjects

N.Yu. Kruchinin and M.G. Kucherenko

Center of Laser and Informational Biophysics, Orenburg State University, prosp. Pobedi 13, Orenburg, 460018 Russia

Using molecular dynamics simulation, we studied the electrically induced conformational changes of polyampholytic polypeptides associated with model metal atomic clusters on the surface of metal-like nanoparticle and substrate with a uniform distribution of electric charge, as well as on the surface of a polarized nanoparticle. The average distances between atomic clusters bound to a polypeptide and adsorbent with a change in the charge density on its surface are calculated. Electrically induced changes in the conformations of the polyampholyte led to a significant shift of the atomic clusters associated with the macrochain relative to the adsorbing surface of the nanoobject, which can be used in sensors based on the effects of surface plasmon resonance and giant Raman scattering, as well as in nanoprobe with adjustable or switchable parameters under the influence of an electric field.

Keywords: molecular dynamics, polyampholytic polypeptides, atomic clusters, nanoparticles, adsorption, electrically induced conformational changes

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА И БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ ИЗОТОПНЫМ $^2\text{H}/^1\text{H}$ -СОСТАВОМ

© 2020 г. С.В. Козин*, **, А.А. Кравцов*, **, К.К. Туроверов***, А.В. Фонин***, Е.В. Чихиржина***, В.В. Малышко**, ****, А.В. Моисеев*****, А.В. Чуркина*

*Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149

**Южный научный центр РАН, 344006, Ростов-на-Дону, просп. Чехова, 41

***Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

****Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ, 350063, Краснодар, ул. Седина, 4

*****Кубанский государственный аграрный университет, 350004, Краснодар, ул. Калинина, 13

E-mail: kozinsv85@mail.ru

Поступила в редакцию 123.123.2019 г.

После доработки 123.123.2019 г.

Принята к публикации 123.123.2019 г.

Установлено, что среда с пониженным содержанием дейтерия не оказывает влияния на вторичную структуру пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина и не вызывает конформационных изменений в структуре этих белков. Помещение данных белков в буферный раствор, приготовленный на обедненной дейтерием воде, приводило к уменьшению интенсивности собственной триптофановой флуоресценции, при этом спектры кругового дихроизма практически не изменялись. Снижение содержания дейтерия в реакционной среде приводило к уменьшению активности пероксидазной реакции окисления *o*-дианизидина и люминола пероксидом водорода.

Ключевые слова: дейтерий, протий, изотопный обмен, пероксидаза хрена, бычий сывороточный альбумин, собственная триптофановая флуоресценция, спектроскопия кругового дихроизма, кинетика реакции.

DOI: 10.31857/S0006302920020039

Известно, что в природе содержание дейтерия в воде колеблется в разных регионах планеты, но в среднем находится на уровне около 150 ppm [1, 2]. Также экспериментально установлено, что даже относительно небольшое изменение изотопного состава воды (двух-трехкратное повышение или понижение содержания дейтерия) существенным образом сказывается на метаболизме как микроорганизмов [3–5], так и высших растений [6–8] и животных, а также характеризуется изменением активности модельных систем [9]. Полученные на сегодняшний день данные свидетельствуют в пользу того, что дейтерий является необходимым элементом для нормального метаболизма живых систем, а колебания его концентрации способны как стимулировать, так и угнетать разнообразные физиологические процессы [10]. Например, возрастание содержания дейтерия в воде вызывает изменение физиологии и морфологии клеток и нередко оказывает отрицательное влияние на их метаболизм. С другой стороны, снижение содержания дейтерия главным

образом благотворно сказывается на функциональной активности организма [11–13].

Однако несмотря на достаточно широкий спектр результатов о стимулирующем влиянии понижения содержания дейтерия в потребляемой воде на физиологические функции живых систем [14–17], механизм этого феномена до сих пор остается не вполне ясным, хотя установлено, что всегда происходит изменение изотопного состава тканей внутренних органов [18]. Считается, что термодинамическая неравноценность изотопологов воды, обусловленная различиями свойств ядер протия и дейтерия, вызывает появление кинетического изотопного эффекта. Предполагается, что различия в кинетике химических и биохимических реакций в воде с различным содержанием дейтерия могут являться следствием большей прочности связи D–O по сравнению со связью H–O [19]. В ряде работ рассматривается роль воды как ключевого фактора, определяющего физико-химические свойства растворов [20, 21]. Кроме того, при изменении изотопного со-

става воды диссоциирующие атомы водорода растворенных биомолекул подвергаются замещению и при уменьшении содержания дейтерия в растворителе происходит его замещение протием в молекулах органических соединений, а повышение содержания дейтерия в воде приводит к дейтерированию биомолекул. Этот процесс обратим и протекает с большей скоростью и вероятностью у атомов водорода, которые находятся ближе к поверхности биомолекулы и менее прочно связаны с соседними атомами (азота, кислорода, серы и других). Очевидно, что в силу различий свойств протия и дейтерия такое замещение может приводить к изменению экспрессии регуляторных белков [22], а также, возможно, к изменению структуры белков, кроме того, поскольку существенная часть белков — это ферменты, осуществляющие катализ самых разнообразных и часто критически важных для метаболизма реакций, логично ожидать, что даже относительно небольшие изменения их конформации будут иметь весьма серьезные последствия для функционирования как отдельных клеток, так и всего организма. Ввиду этого представляется весьма актуальным исследование влияния изменения изотопного состава воды на структуру растворенных в ней белков.

Целью исследования являлось изучение влияния сниженного содержания дейтерия в растворе на функциональные свойства пероксидазы хрена и структуру бычьего сывороточного альбумина.

МЕТОДЫ

Обедненную по дейтерию воду получали на установке, разработанной в Кубанском государственном университете [23–25]. Затем полученную воду с пониженным содержанием дейтерия и дистиллированную воду с естественным содержанием дейтерия подвергали дополнительной очистке в системе очистки воды LaboStar TWF 7 (Evoqua, Германия) до показателей по сопротивлению 18.2 МОм·см.

Для определения активности пероксидазы хрена в средах с различным содержанием дейтерия (50 и 150 ppm, здесь и далее в ppm указано содержание дейтерия) использовали две модельные системы. Первая представляет собой реакцию пероксидазного окисления *o*-дианизидина (Sigma-Aldrich, США) пероксидом водорода [26, 27]. Вторая модельная система — сопровождающееся хемилюминесценцией окисление люминола пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена [28].

Для этих модельных систем были приготовлены следующие растворы: стоковый (основной) раствор пероксидазы хрена (Sigma-Aldrich, США) готовили в 0.01 М калий-фосфатном буфере (pH 7.5), приго-

товленном на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm); за два часа до измерений готовили два рабочих раствора пероксидазы и термостатировали при 37°C — первый рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH 7.5), приготовленного на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm); второй рабочий раствор готовили разведением основного раствора фосфатным буфером, приготовленным на воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm). Концентрацию пероксидазы в рабочих растворах, составившую 7.5 нг/мл, определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 403 нм ($\epsilon_{403} = 10 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [29]). Растворы перекиси готовили разбавлением исходного 38%-го раствора водой. Концентрацию пероксида водорода определяли титриметрически с раствором перманганата калия. Раствор *o*-дианизидина готовили в этаноле по навеске до его конечной концентрации 0.25 мг/мл. Люминол (Sigma-Aldrich, США) растворяли в диметилсульфоксиде также по навеске до концентрации 7 мг/мл. Из этого раствора готовили рабочий раствор люминола путем стократного разведения фосфатным буфером (150 ppm).

Первый эксперимент состоял из следующих этапов: в шестилуночные планшеты с диаметром лунки 3.5 см последовательно приливали 2 мл рабочего буферного раствора пероксидазы и 0.1 мл спиртового раствора *o*-дианизидина. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода требуемой концентрации в объеме 0.1 мл. Кинетику реакции изучали спектрофотометрически, измеряя начальную скорость окисления *o*-дианизидина (V_0) при длине волны 460 нм ($\epsilon_{460} = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для конечного продукта при температуре 37°C [30]). Измерения проводили на многофункциональном ридере для микропланшетов FilterMax F5 (Molecular Devices, США). По результатам измерений строили график зависимости начальной скорости пероксидазной реакции окисления от начальной концентрации пероксида водорода при постоянной концентрации *o*-дианизидина. Линеаризацию зависимости начальной скорости пероксидазной реакции окисления от начальной концентрации пероксида водорода осуществляли в координатах Лайнуивера—Берка и Иди—Хофсти. По данным графикам определяли максимальную скорость реакции и константу Михаэлиса.

Эксперимент со второй модельной системой состоял в следующем: к 2 мл рабочего буферного раствора пероксидазы (50 и 150 ppm) при температуре 37°C добавляли 15 мкл люминола. Реакцию инициировали добавлением пероксида водорода (0.25 мМ) в объеме 30 мкл. Свечение, вызванное окислением люминола пероксидом водорода в отсутствие фермента, было на уровне фонового. Кинетику реакции измеряли хемилюминесцентным методом с помощью аппаратно-

программного комплекса «Lum-5773» (ООО «ДИСофт», Москва) и специализированного программного обеспечения PowerGraph 3 Professional с определением светосуммы и тангенса угла наклона касательной [31].

Структуру пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным содержанием дейтерия (50 и 150 ppm) изучали с помощью спектров собственной флуоресценции этих белков и спектров кругового дихроизма. Для этого были приготовлены следующие растворы: стоковые (основные) растворы пероксидазы и альбумина готовили на воде с природным содержанием дейтерия (150 ppm) в 0.01 М калий-фосфатном буфере при pH 7.5. За два часа до измерений готовили два рабочих раствора пероксидазы и два рабочих раствора альбумина и термостатировали при 37°C. Первый рабочий раствор для каждого белка готовили разведением основного раствора фосфатным буфером (pH 7.5, 150 ppm). Второй рабочий раствор для обоих белков готовили разведением основного раствора фосфатным буфером, приготовленным на обедненной дейтерием воде (50 ppm). Концентрацию пероксидазы и альбумина, составившую 0.1 мг/мл, в рабочих растворах определяли спектрофотометрически: $\varepsilon_{403} = 10 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для пероксидазы хрена [5] и $\varepsilon_{279} = 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ для бычьего сывороточного альбумина [32, 33].

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, Австралия). Собственную триптофановую флуоресценцию возбуждали светом длиной волны 297 нм [33], а совместную триптофановую и тирозиную флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длиной волны 280 нм [34, 35]. Спектры кругового дихроизма регистрировали на дихрографе J-810 (Jasco Inc., США).

Статистическую обработку данных проводили на лицензионной программе Statistika 10 с помощью *t*-критерия Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ

При исследовании ферментативной реакции в модельной системе «*o*-дианизидин – пероксидаза хрена – H_2O_2 » установлено, что зависимость начальной скорости реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в средах с разным содержанием дейтерия (50 ppm и 150 ppm) имеет общий линейный характер при малых концентрациях перекиси водорода (от 0.01 до 0.1 мМ) и указывает в данном диапазоне концентраций окислителя на первый порядок ферментативной реакции. При дальнейшем увеличении концентрации субстрата окислителя (от 0.25 до 1 мМ) происходит выход

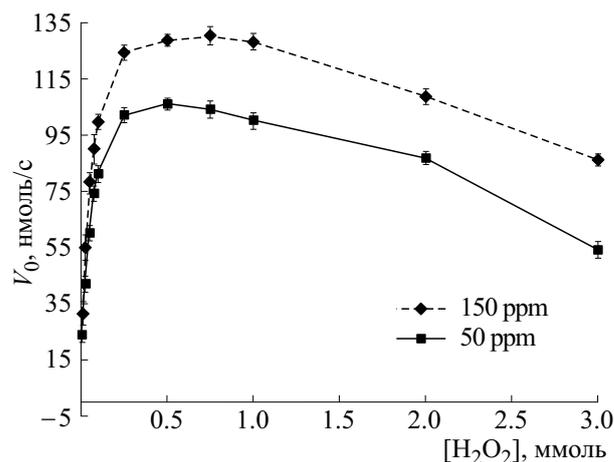


Рис. 1. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода ($M \pm m$) в среде с пониженным содержанием дейтерия (pH 7.5).

реакции на плато, где ее начальная скорость практически перестает зависеть от концентрации пероксида водорода (порядок ферментативной реакции становится нулевым). Таким образом, в диапазоне концентраций от 0.01 до 1 мМ данная ферментативная реакция описывается уравнением Михаэлиса–Ментен. При более высоких концентрациях H_2O_2 (больше 1 мМ) в средах с содержанием дейтерия 50 ppm и 150 ppm происходит ингибирование реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода. В среде, приготовленной на обедненной дейтерием воде, начальная скорость реакции достоверно меньше, чем в среде с концентрацией дейтерия 150 ppm, во всех исследуемых разведениях (рис. 1).

Линеаризацию проводили в двойных обратных координатах Лайнуивера–Берка и координатах Иди–Хофсти, поскольку при таких концентрациях окислителя ферментативная реакция описывается уравнением Михаэлиса–Ментен (рис. 2 и 3), по результатам построения были найдены максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса (таблица).

Анализ полученных экспериментальных прямых в двух координатных системах показал, что максимальная скорость реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода была выше в среде, приготовленной на воде с природным содержанием дейтерия. Константа Михаэлиса, полученная в координатах Лайнуивера–Берка, была выше на 26% для ферментативной реакции, протекающей в обедненном дейтерием буфере. В координатах Иди–Хофсти данный показатель был больше на 20% в среде со сниженной концентрацией дейтерия, что указывает на меньшее сродство субстрата с ферментом

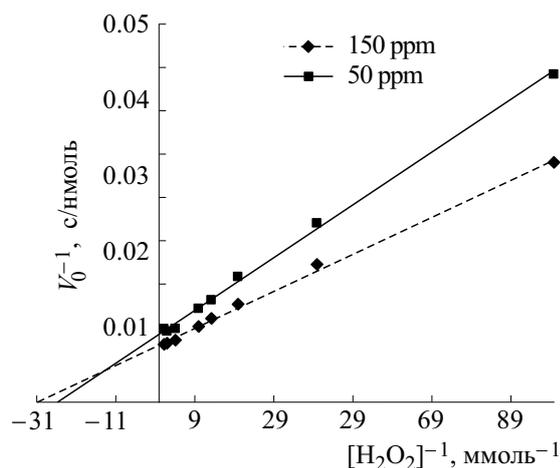


Рис. 2. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в координатах Лайнуивера–Берка в среде с пониженным содержанием дейтерия (рН 7,5).

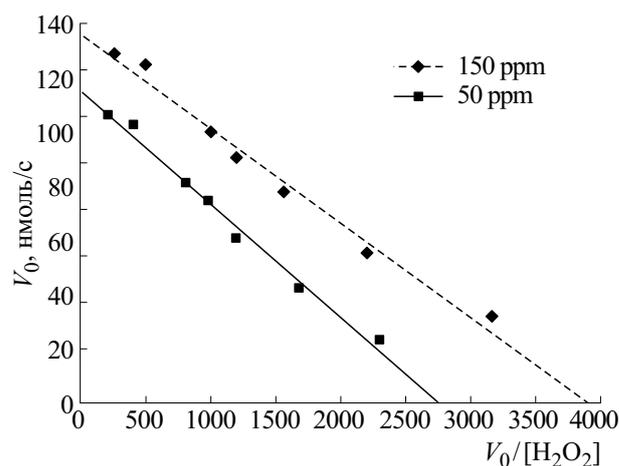


Рис. 3. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления *o*-дианизидина от начальной концентрации пероксида водорода в координатах Иди–Хофсти в среде с пониженным содержанием дейтерия (рН 7,5).

в данной модельной системе, когда содержание дейтерия в три раза меньше естественного.

Результаты исследования хемилюминесцентной реакции пероксидазного окисления люминола пероксидом водорода в модельной системе «люминол – пероксидаза хрена – H_2O_2 » с различным содержанием дейтерия представлены в таблице. Интегральный показатель свечения, а также тангенс угла наклона кривой нарастания были достоверно меньше ($p < 0.05$, рис. 4) в реакционной среде, приготовленной на воде с концентрацией дейтерия 50 ppm.

Данные кинетические параметры отражают интенсивность свечения, развиваемого в ходе пероксидазного окисления люминола. Интенсивность хемилюминесценции данной реакции пропорциональна скорости генерации радикалов люминола. Таким образом, уменьшение интенсивности хемилюминесценции при окислении люминола пероксидазой хрена в среде, приготовленной на обедненной дейтерием воде, можно объяснить снижением активности фермента в данных условиях реакции.

При оценке собственной триптофановой флуоресценции пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина установлено, что интенсивность флуоресценции альбумина была примерно в десять раз выше, чем у пероксидазы. Данные отличия вызваны различиями как в количестве триптофана в молекулах этих белков, так и в их микроокружении. Белок альбумин имеет два триптофановых остатка, один из них расположен интрамолекулярно, а другой – на поверхности молекулы. Взаимодействие поверхностного триптофана альбумина с молекулами растворителя приводит к смещению максимума длины волны испускания в длинноволновую область. Несмотря на то что в ферменте единственный триптофановый остаток расположен внутри гидрофобной части молекулы, его спектр флуоресценции также имеет длинноволновый максимум. Это вызвано ван-дер-ваальсовым взаимодействием между триптофаном и гемом фермента. Снижение концентрации дейтерия в растворителе не вызвало заметного сдвига максимума эмиссии в коротковолновую или длинноволновую область спектра. При нахождении белков в растворителе с концентрацией дейтерия

Показатели активности пероксидазы хрена в средах с разным содержанием дейтерия

2H среды, ppm	k_M (Л. – Б.), мм	k_M (Ид. – Х.), мм	V_{max} (Л. – Б.), нмоль/с	V_{max} (Ид. – Х.), нмоль/с	Светосумма, усл. ед.	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$
150	0.026	0.035	131	136	3637 ± 49	53.0 ± 1.5
50	0.033	0.042	111	115	$2557 \pm 124^*$	$18.7 \pm 0.6^*$

Примечание. * – $p < 0.05$ к группе 150 ppm, данные представлены в виде $M \pm m$, «Л. – Б.» – координаты Лайнуивера–Берка, «Ид. – Х.» – координаты Иди–Хофсти.

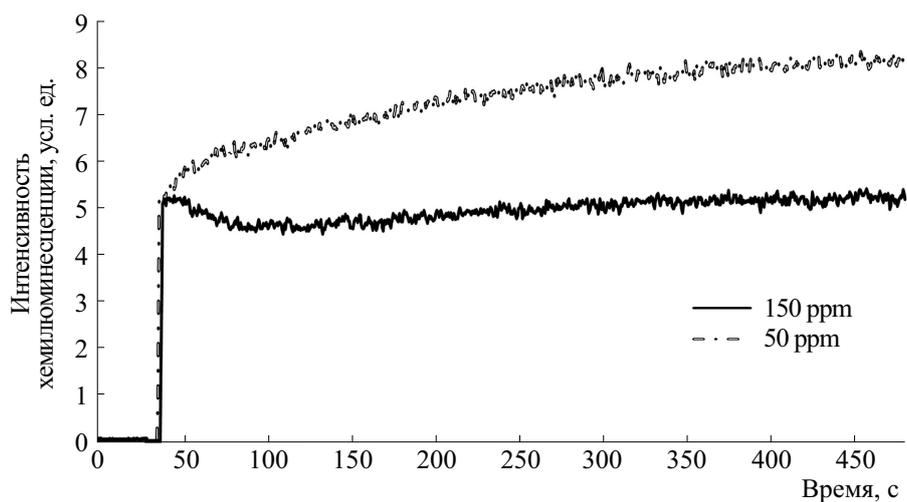


Рис. 4. Кинетические кривые хемилуминесцентной реакции окисления люминола пероксидазой хрена в среде с пониженным содержанием дейтерия.

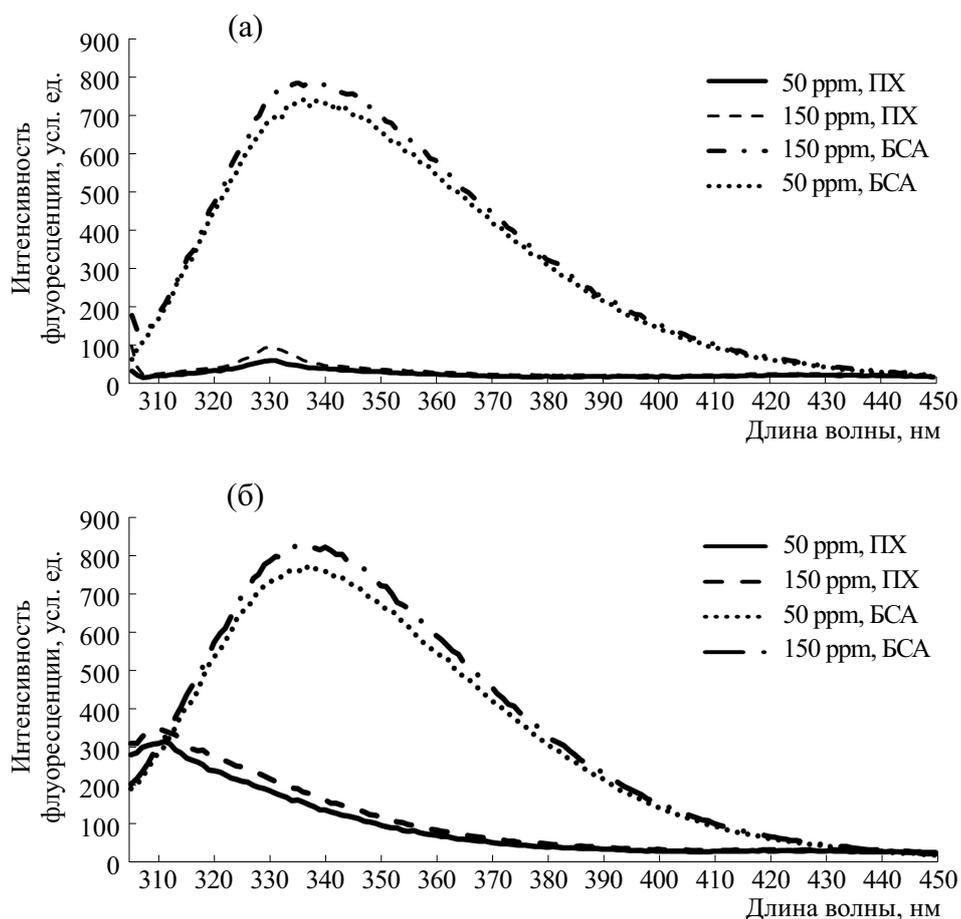


Рис. 5. Интенсивность флуоресценции бычьего сывороточного альбумина и пероксидазы хрена в среде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm): (а) – триптофановая флуоресценция (297 нм), (б) – триптофановая и тирозиновая флуоресценция (280 нм).

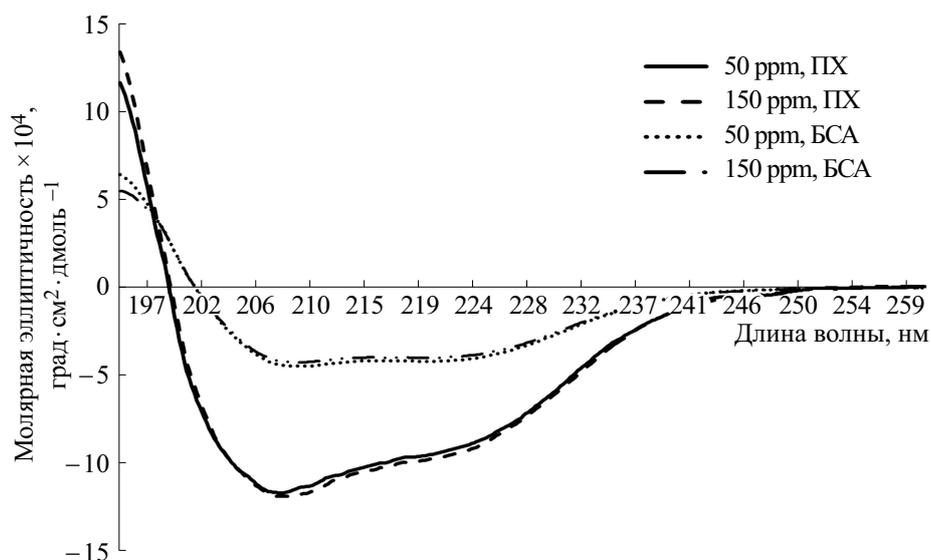


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма (дальний ультрафиолетовый диапазон) пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в среде с пониженным содержанием дейтерия.

50 ppm наблюдалось снижение интенсивности флуоресценции в обоих образцах (рис. 5а).

Особенности собственной триптофановой и тирозиновой флуоресценции могут быть обусловлены тем, что количество тирозина в альбумине составляет девятнадцать против семи в молекуле пероксидазы хрена. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм интенсивность флуоресценции альбумина была примерно в два с половиной раза выше, чем в пероксидазе. Для альбумина интенсивность флуоресценции при длине возбуждения 280 и 297 нм практически не отличалась (разница не превышала 5%). Это может означать, что основной вклад в совместную флуоресценцию альбумина вносят остатки триптофана. В пероксидазе происходило резкое увеличение интенсивности флуоресценции при 280 нм. Таким образом, основной вклад в совместную флуоресценцию фермента вносят тирозиновые остатки. Максимум испускания для альбумина составил 335 нм, а для пероксидазы — 310 нм. Коротковолновый максимум флуоресценции у молекулы пероксидазы хрена связан, возможно, с гидрофобным окружением тирозиновых остатков. Среда с пониженным содержанием дейтерия не повлияла на положение максимумов в спектрах опытных белков, но при этом вызвала снижение интенсивности флуоресценции (рис. 5б).

Исследование спектров кругового дихроизма показало, что в далекой УФ-области для обоих белков имеются два минимума в области 207–220 нм. При этом для пероксидазы кривая пересекает нулевую линию в точке 199 нм, а для альбумина эта точка равна 201 нм. Спектры с такой амплитудой

и формой характерны для глобулярных белков с высокоупорядоченной вторичной структурой. Известно, что эллиптичность при 220 нм является мерой упорядоченности структуры белка. Амплитуда спектра пероксидазы в данной точке была в два с половиной раза больше, чем у альбумина, что говорит о большом содержании β -слоев во вторичной структуре альбумина (рис. 6). Необходимо отметить, что уменьшение концентрации дейтерия в растворителе не оказало влияния на вторичную структуру обоих белков.

Известно, что у альбумина основными тушителями триптофановой флуоресценции являются молекулы растворителя (воды), а также тирозиновые остатки за счет переноса энергии по диполь-дипольному механизму. В то же время у молекулы пероксидазы хрена основным акцептором энергии триптофана и тирозина является простетическая группа (гем). Также безизлучательный перенос энергии с этих хромофоров возможен за счет их ферстеровского взаимодействия между собой.

Можно предположить, что тушение собственной тирозиновой и триптофановой флуоресценции в среде с пониженным содержанием дейтерия происходит по одному из вышеуказанных механизмов. Однако спектрометрия кругового дихроизма не показала заметного изменения во взаимном расположении молекулярных структур «гем–триптофан» в пероксидазе и «триптофан–тирозин» в обоих белках. Также не наблюдался сдвиг максимумов спектров испускания в обоих белках при изменении концентрации дейтерия в растворителе, что указывает на постоянное окружение хромофоров. Известно, что атомы водоро-

да, связанные с атомами, имеющими свободную пару электронов, как правило, претерпевают быстрый обмен с другими атомами водорода. Помещение биополимеров в среду с измененным по дейтерию изотопным составом приводит к изменению соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в их составе. Так, в водных растворах белков изотопный обмен $^2\text{H}/^1\text{H}$ происходит быстро в атомах водорода, связанных с атомами азота, серы или кислорода, в то время как атомы водорода, связанные с углеродом практически не подвержены изотопному обмену. Изотопное замещение дейтерия на протий протекает с минимальной скоростью в экранированных гидрофобных участках молекулы, а также в составе пептидных групп, испытывающих сферическое затруднение. Напротив, $^2\text{H}/^1\text{H}$ -обмен происходит с высокой интенсивностью в функциональных группах, активно взаимодействующих с растворителем. Вероятно, при растворении исследуемых белков в среде с пониженным содержанием дейтерия происходит локальное замещение атомов дейтерия на протий в поверхностной структуре белка, контактирующей с гидратной оболочкой. Такое замещение приводит к уменьшению энергии водородной связи между функциональными группами аминокислотных остатков с молекулами воды. Возможно, в результате ослабления водородных связей с молекулами растворителя амплитуда колебаний боковых групп аминокислот, смотрящих в гидрофильную область, увеличивается. В литературе имеются данные, что в белках тушение собственной флуоресценции может происходить за счет функциональных групп соседних аминокислотных остатков [34]. Можно предположить, что усиление подвижности соседних аминокислотных радикалов, окружающих тирозиновые и триптофановые остатки, находящиеся вблизи поверхности белка, приводит к возрастанию вероятности переноса энергии с хромофоров на функциональные группы соседних акцепторов.

Таким образом, проведенные оптические исследования структуры пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина показали, что среда с пониженным содержанием дейтерия не оказывает влияния на вторичную структуру данных белков и не вызывает конформационных изменений в структуре фермента, затрагивающих его активный центр. Возможные локальные изменения в поверхностной структуре белка, вызванные изотопным замещением дейтерия на протий, вероятно, не могут стать причиной уменьшения ферментативной активности, наблюдаемой нами в двух исследованных модельных системах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-44-233005) и Государственного задания ЮНЦ РАН (№ АААА-А19-119040390083-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. L. Schmidt, R. J. Robins, and R. A. Werner, *Isotopes in Environmental and Health Studies* **51** (1), 155 (2015).
2. M. I. Bykov, S. S. Dzhimak, A. A. Basov, et al., *Voprosy Pitaniia* **84** (4), 89 (2015).
3. D. I. Nikitin, M. N. Oranskaya, and V. I. Lobyshev, *Biophysics* **48** (4), 636 (2003).
4. А. А. Киркина, В. И. Лобышев, О. Д. Лопина и др., *Биофизика* **59** (2), 399 (2014).
5. A. A. Samkov, S. S. Dzhimak, M. G. Barishev, et al., *Biophysics* **60** (1), 107 (2015).
6. V. I. Lobyshev and L. P. Kalinichenko, *Isotopic effects of D_2O in biological systems* (Nauka, M., 1978).
7. A. Basov, L. Fedulova, E. Vasilevskaya, and S. Dzhimak, *Molecules* **24** (22), 4101 (2019). DOI: 10.3390/molecules24224101.
8. А. В. Косенков, М. В. Гуляев, В. И. Лобышев и др., *Биофизика* **63** (5), 1021 (2018).
9. S. Rodin, P. Rebellato, A. Lundin, et al., *Sci. Rep.* **8** (1), e16249 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-34704-0.
10. A. A. Kravtsov, S. V. Kozin, and E. R. Vasilevskaya, *J. Pharmacy & Nutrition Sci.* **8** (2), 42 (2018). DOI: 10.6000/1927-5951.2018.08.02.3.
11. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, et al., *Nutrients* **11** (8), 1903 (2019). DOI: 10.3390/nu11081903.
12. С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина и др., *Биофизика* **64** (2), 362 (2019).
13. A. A. Basov, A. A. Elkina, A. A. Samkov, et al., *Iranian Biomed. J.* **23** (2), 129 (2019). DOI: 10.29252/23.2.129.
14. A. Rasooli, F. Fatemi, R. Hajhosseini, et al., *Pharmaceut. Biol.* **57** (1), 125 (2019). DOI: 10.1080/13880209.2018.1563622.
15. K. Yavari and L. Kooshesh, *Nutrition and Cancer* **71** (6), 1019 (2019). DOI: 10.1080/01635581.2019.1595048.

16. I. M. Chernukha, L. V. Fedulova, E. A. Kotenkova, et al., *Voprosy Pitaniia* **85** (5), 36 (2016).
17. S. S. Dzhimak, A. A. Basov, A. A. Elkina, et al., *Jundishapur J. Natural Pharmaceut. Products* **13** (2), e69557 (2018). DOI: 10.5812/jjnpp.69557.
18. A. A. Basov, S. V. Kozin, I. M. Vikov, et al., *Biol. Bull.* **46** (6), 531 (2019). DOI: 10.1134/S1062359019060049.
19. О. Ю. Зрелов, А. В. Сыроешкин, Е. В. Успенская и др., *Хим.-фармацевт. журн.* **49** (6), 51 (2015).
20. В. В. Гончарук, В. Б. Лапшин, Т. Н. Бурдейная и др., *Химия и технология воды* **33** (1), 15 (2011).
21. A. V. Syroeshkin, N. V. Antipova, A. V. Zlatska, et al., *J. Trace Elements Med. Biol.* **50**, 629 (2018).
22. X. Zhang, M. Gaetani, A. Chernobrovkin, et al., *Mol. Cell Proteomics* **18** (12) 2373 (2019). DOI: 10.1074/mcp.RA119.001455.
23. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин и С. С. Джимама, *Наука Кубани* **3**, 18 (2010).
24. М. Г. Барышев, С. Н. Болотин, В. Ю. Фролов и др., *Экол. вестн. науч. центров ЧЭС*, № 1, 13 (2013).
25. I. S. Petriev, S. N. Bolotin, V. Y. Frolov, et al., *Bull. Rus. Acad. Sci.* **82** (7), 807 (2018).
26. О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова и И. В. Березин, *Биохимия* **42**, 1372 (1977).
27. N. V. Yaglova, D. A. Tsomartova, S. S. Obernikhin, et al., *Biol. Bull.* **46** (1), 74 (2019). DOI: 10.1134/S1062359018060122.
28. Д. Ю. Измайлов, Е. В. Проскурина, С. А. Шишканов и др., *Биофизика* **62** (4), (2017).
29. В. В. Рогожин, Г. Д. Кутузова и Н. Н. Угарова, *Биоорганическая химия* **26** (2), 156 (2000).
30. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
31. А. М. Поляничко, Н. В. Михайлов, Н. М. Романов и др., *Цитология* **58** (9), 707 (2016).
32. L. M. Danilenko, *Research Res. Pharmacol.* **4** (1), 81 (2018).
33. О. В. Степаненко, И. М. Кузнецова, К. К. Турове-ров и др., *Цитология* **47** (11), 988 (2005).
34. N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, D. A. Tsomartova, et al., *Bull. Experim. Biol. Med.* **165** (4), 508 (2018). DOI: 10.1007/s10517-018-4205-8.
35. J. A. Ross, W. R. Laws, and K. W. Rouslang, *Topics in fluorescence in spectroscopy* (Springer US, 2002).

Change of Functional Activity of Horseradish Peroxidase and Bovine Serum Albumin in Media with Various Isotopic $^2\text{H}/^1\text{H}$ Composition

S.V. Kozin^{*, **}, A.A. Kravtsov^{*, **}, K.K. Turoverov^{***}, A.V. Fonin^{***}, E.V. Chihirzhina^{***}, V.V. Malyshko^{**}, ^{****}, A.V. Moiseev^{*****}, and A.V. Churkina^{*}

^{*}Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia

^{**}Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

^{***}Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

^{****}Kuban State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Sedina 4, Krasnodar, 350063 Russia

^{*****}Kuban State Agrarian University, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350004 Russia

Experiments have revealed that the medium with reduced deuterium content has no effect on the secondary structure of horseradish peroxidase and bovine serum albumin and no conformational changes occur in the structure of these proteins. The addition of these proteins into the buffer solution prepared on deuterium-depleted water led to a decrease in the intensity of intrinsic tryptophan fluorescence, while the circular dichroism spectra remained virtually unchanged. At lower deuterium content in the reaction medium, there was a decrease in the activity of the peroxidase oxidation reaction of o-dianisidine and luminol with hydrogen peroxide.

Keywords: deuterium, protium, isotopic metabolism, horseradish peroxidase, bovine serum albumin, intrinsic tryptophan fluorescence, circular dichroism spectroscopy, reaction kinetics

РОЛЬ ЛИНКЕРНЫХ ГИСТОНОВ В СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА. 2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК И ЯДЕРНЫМИ БЕЛКАМИ

© 2020 г. Е.В. Чихиржина*, Т.Ю. Старкова*, А.М. Поляничко*, **

*Институт цитологии РАН, 194064, Санкт–Петербург, Тихорецкий просп., 4

E-mail: chikhir@gmail.com

**Санкт–Петербургский государственный университет,
199034, Санкт–Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Поступила в редакцию 30.01.2019 г.

После доработки 02.10.2019 г.

Принята к публикации 24.01.2020 г.

В первой части обзора (Биофизика, 63, 1070 (2018)) были рассмотрены структура линкерных гистонов семейства H1, их посттрансляционные модификации, а также роль гистона H1 в формировании компактного транскрипционно неактивного хроматина. Вторая часть посвящена роли линкерных гистонов семейства H1 в структурной организации хроматина на различных уровнях: от нуклеосом до метафазных хромосом. Обсуждаются механизмы взаимодействия гистона H1 с другими элементами хроматина, в том числе с ДНК и ядерными белками.

Ключевые слова: ДНК, коровые гистоны, линкерный гистон H1, нуклеосома, структура хроматина, HMG белки.

DOI: 10.31857/S0006302920020040

В последние годы опубликовано большое количество работ, посвященных исследованию структурной организации хроматина и основанных на сочетании разнообразных молекулярно-биологических, биохимических, физических и математических подходов [1–11]. Среди них – данные электронной и атомно-силовой микроскопии [12–14], рентгеноструктурного анализа [3, 15–18], методов молекулярной спектроскопии [19–24], в т.ч. кругового дихроизма [25–33], флуоресцентной спектроскопии [34, 35], методов биоинформатики [11] и т. д. Согласно современным представлениям ключевую роль в структурной организации хроматина играют ДНК-белковые и белок-белковые взаимодействия. В первой части обзора [36] нами были рассмотрены вопросы, касающиеся структуры линкерных гистонов, посттрансляционные модификации гистона H1 и их роль в функционировании хроматина. Особое внимание было уделено особенностям структуры линкерных гистонов H1 в ядрах транскрипционно неактивных клеток, отличающихся высокой степенью компактизации ДНК. Во второй части обзора мы предприняли попытку отразить наиболее интересные, с нашей точки зрения, результаты, иллюстрирующие роль линкерных гистонов

семейства H1 в формировании различных уровней структурной организации хроматина.

НУКЛЕОСОМА

Структура хроматина характеризуется достаточно сложной многоуровневой организацией, которая обеспечивается разнообразными ДНК-белковыми и белок-белковыми взаимодействиями (рис.1). Самыми многочисленными из ядерных белков, принимающих участие в формировании структуры хроматина, являются белки гистоновой группы, характеризующиеся высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков лизина и аргинина. Белки данного типа подразделяются на две функционально различные группы: так называемые коровые (H2A, H2B, H3 и H4) и линкерные гистоны семейства H1 (в эритроцитах птиц существует вариант, названный H5). Именно взаимодействие гистоновых белков с ядерной ДНК обеспечивает формирование первого и наиболее хорошо изученного уровня структурной организации хроматина – нуклеосом, которые традиционно считаются элементарными структурными единицами хроматина.

Значительный прогресс в изучении механизма упаковки ДНК в хроматине был достигнут еще в

При подготовке рукописи все авторы внесли равный вклад.

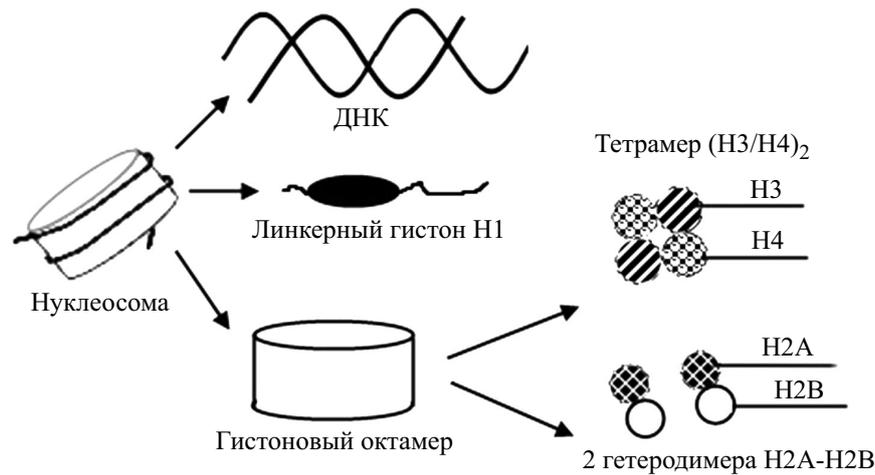


Рис. 1. Уровни структурной организации хроматина.

1974 г. после открытия субъединичной структуры хроматиновой фибриллы. С помощью метода электронной микроскопии было установлено, что у всех эукариот элементарная хроматиновая фибрилла представляет собой линейно упорядоченную цепочку периодически повторяющихся субъединиц — нуклеосом, которые соединяются линкерной ДНК [12]. Затем методом дифракции нейтронов была показана локализация ДНК в нуклеосоме снаружи белковой частицы [37].

Нуклеосома состоит из белковой сердцевинки (так называемый кор, от англ. «core»), по форме напоминающей цилиндр диаметром 11 нм и высотой 5,7 нм, вокруг которого уложен по спирали фрагмент ДНК длиной ~146 п.н. (рис. 1) [17]. ДНК на поверхности белковой частицы стабилизирована многочисленными электростатическими взаимодействиями и водородными связями [15]. Белковый кор формируется при взаимодействии друг с другом гистонов H2A, H2B, H3 и H4 [3, 5, 6, 15, 38], откуда и происходит термин «коровые гистоны». Коровые гистоны представляют собой небольшие (102–135 а.о.) высококонсервативные глобулярные белки с молекулярной массой 11–16 кДа [3, 15, 38, 39]. Коровая частица содержит по две молекулы каждого из четырех гистонов: центральный тетрамер (H3/H4)₂ и два гетеродимера H2A–H2B, расположенные на периферии. Данные рентгеноструктурного анализа с разрешением 1.9 Å [40] и 2.8 Å [15] подтвердили, что на белковую коровую частицу накручен участок двухцепочечной ДНК длиной 145–147 п.н. с образованием левозакрученной суперспирали (80 п.н. на виток), при этом боковые группы аминокислотных остатков коровых гистонов взаимодействуют с ДНК.

Совсем недавно получено экспериментальное подтверждение возможности структурных пере-

строек внутри коровой частицы [41–43], которые играют ключевую роль в процессах ремоделирования хроматина. В частности, для разворачивания молекулы ДНК при транскрипции и для стабильности самой нуклеосомы необходима некоторая пластичность димера H2A–H2B. При накручивании ДНК на поверхность гистонового октамера 121 из 146 п.н., входящих в состав нуклеосомы, связываются с глобулярными доменами гистонов. Оставшиеся 25 п.н. взаимодействуют с вытянутыми N-концевыми участками коровых гистонов, которые выходят на поверхность нуклеосомы сквозь витки ДНК приблизительно через каждые 20 п.н. [15, 38, 44–47]. Высокая эволюционная консервативность аминокислотной последовательности коровых гистонов обеспечивает, помимо прочего, эффективную самосборку нуклеосомы, а многочисленные посттрансляционные модификации коровых гистонов позволяют сделать этот процесс обратимым и управляемым [4, 10, 48, 49].

Во всех эукариотических клетках нуклеосомы соединены между собой коротким фрагментом ДНК, так называемым «линкерным» участком, формируя структуру типа «бусины–на–нити» (beads–on–a–string) [38]. Нуклеосома вместе с линкерной ДНК образуют полную нуклеосому. В отличие от инвариантной структуры нуклеосомы, одинаковой в хроматине всех эукариот, полные нуклеосомы в ядрах клеток различных видов могут существенно отличаться как за счет различий в длине линкерной ДНК, так и по структуре связанного с ней гистона H1. Длина фрагмента ДНК в составе полной нуклеосомы может варьировать в клетках различных тканей от 195–200 п.н. в активном хроматине до 230–270 п.н. в его транскрипционно неактивных областях. Недавно было обнаружено [50], что при обработке экзонуклеазой III можно получить две новые

промежуточные частицы, названные авторами «протохроматосомы», содержащие по 7 п.н. линкерной ДНК соответственно с одного или с обоих концов нуклеосомы. Эти частицы, по мнению авторов работы [50], могут определять свойства сайта связывания гистона H1, однако в деталях роль прото-хроматосомной частицы в структурной организации хроматина пока не ясна.

По сравнению с коровыми гистонами, структурно-функциональные особенности взаимодействия H1 с другими элементами хроматина, равно как и структурные характеристики этого белка в свободном состоянии, существенно менее изучены [36]. Взаимодействие гистона H1 с линкерной ДНК на входе/выходе из нуклеосомы [47] приводит к стабилизации нуклеосомного комплекса путем «стягивания» расположенных по соседству нуклеосом [51, 52] и способствует формированию высших (наднуклеосомных) уровней структурной организации хроматина, таких как 30-нанометровая фибрилла [40].

ПОСТНУКЛЕОСОМНЫЙ УРОВЕНЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА

Следующий уровень структурной организации хроматина — формирование 30-нанометровой фибриллы — обеспечивает дополнительное уменьшение линейных размеров ДНК в 40–50 раз. Формирование 30-нанометровой фибриллы происходит в два этапа: образование цепи нуклеосом диаметром 10 нм (10-нанометровая фибрилла) вследствие их стягивания гистонам H1 [6, 7] и дальнейшее сворачивания этой 10-нанометровой фибриллы в более компактные наднуклеосомные структуры с диаметром 30 нм [2, 5, 6, 53]. Вместе с тем процессы формирования 30-нанометровых фибрилл обратимы и по сути хроматин представляет собой систему, находящуюся в динамическом равновесии между «открытой» конформацией типа «бусины–на–нити» и компактной 30-нанометровой фибриллой [54]. На формирование последней оказывают существенное влияние различные варианты (подтипы) гистонов, их посттрансляционные модификации, а также различные негистоновые белки хроматина. Фундаментальной структурной единицей 30-нанометровой фибриллы является хроматосома, которая содержит гистоновый октамер и одну молекулу гистона H1, связанные со 165 парами нуклеотидов ДНК [55].

Несмотря на то что структура нуклеосомы была решена достаточно давно, вопрос о структуре хроматосомы до сих пор остается открытым. В 2015 г. была получена первая кристаллическая структура комплекса нуклеосомы с глобулярным доменом гистона H5 и 167 п.н. ДНК [56] с разрешением, близким к атомному (near-atomic resolu-

tion), которая наглядно демонстрирует связывание гистона H1 с ДНК на входе/выходе из нуклеосомы. Взаимодействие линкерного гистона с нуклеосомой происходит за счет связывания Lys и Arg глобулярного домена белка с фосфатными группами основной цепи ДНК. При этом ДНК остается в В-форме [25, 56]. Кроме того, в глобулярном домене гистона H5 располагаются пять ключевых аминокислотных остатков Ile, которые отвечают за связывание этой области с нуклеосомой [57]. Использование метода ядерного магнитного резонанса и криоэлектронной микроскопии позволило установить, что концевые домены гистона H1 не вовлечены в непосредственное взаимодействие с нуклеосомой [57, 58].

В последние годы для исследования структуры нуклеосомы успешно применяются и такие методы, как численное моделирование и малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние (SAXS и SANS). Метод малоуглового рассеяния является мощным инструментом исследования пространственной структуры хроматина и митотических хромосом, который позволяет выявлять периодические структуры в биологических образцах в растворе. Использование нового инструментария поставило под вопрос гипотезу о наличии стабильных уровней структурной организации хроматина более высокого порядка, чем 30-нанометровая фибрилла. Совсем недавно с помощью этого метода было показано, что хроматин в интерфазных ядрах и митотических хромосомах в основном состоит из нерегулярно сложенных волокон без строгой структуры 30-нанометровой фибриллы [59]. Таким образом, авторы пришли к выводу, что в интерфазном и митотическом хроматине компактизация и нерегулярное сворачивание хроматиновой фибриллы может проходить без образования структур диаметром 30 нм. Более подробно познакомиться с этими вопросами можно в опубликованных в последнее время обзорах по структуре хроматина (например, [1, 2, 9, 11, 60–62]).

В настоящее время в литературе рассматриваются два типа моделей вторичной структуры хроматина [13]: модель соленоида (спираль «one-start») и зигзагообразная модель (спираль «two-start»). В первом случае нуклеосомы в фибрилле взаимодействуют с пятой и шестой соседними нуклеосомами, а линкерная ДНК изгибается, образуя спираль [62, 64]. В зигзагообразной модели нуклеосомы расположены в виде зигзага таким образом, что линкерный участок ДНК остается прямым [2].

В образовании 30-нанометровой хроматиновой фибриллы первостепенную роль играет именно длина линкерной ДНК, которая варьирует от 20 п.н. у дрожжей до 35–50 п.н. в соматических клетках позвоночных [2, 5] и до 70–100 п.н.

в спермиях иглокожих [5, 6]. Вариация длины линкерной ДНК обеспечивает разнообразие структуры хроматина в клетках различного типа.

Сравнительный анализ хроматина в транскрипционно неактивных и активных клетках позволяет заключить, что присутствие обогащенных аргинином линкерных белков и большая длина линкерной ДНК обеспечивают плотную упаковку нуклеосом и суперкомпактное состояние хроматина в транскрипционно неактивных клетках. Напротив, короткая линкерная ДНК ответственна за менее компактное расположение хроматин нейронов в состоянии, способном к транскрипции. Таким образом, длина линкерной ДНК является важным параметром, который оказывает существенное влияние на высшие уровни организации и функциональную активность хроматина. Вариация длины линкерной ДНК обеспечивает разнообразие структуры хроматина в клетках различного типа.

На сегодняшний день все еще нет четкого представления о структуре высших уровней организации хроматина. Роль 30-нанометровой хроматиновой фибриллы в ядре не ограничивается компактизацией ДНК. Она также может модулировать возможность доступа специфических последовательностей ДНК для регуляторных факторов. Считается, что 30-нанометровая фибрилла организована в петельные домены (50–150 тыс. п.н.), которые закреплены на ядерном матриксе. При этом каждый домен представляет собой кластер генов, функционально связанных между собой. Природа подобных доменов пока окончательно не ясна, однако, по всей видимости, они построены по принципу суперспирали более высокого порядка.

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА Н1 С ДНК

Взаимодействие ДНК с гистонами семейства Н1 происходит, прежде всего, между отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом и положительно заряженными аминокислотными остатками белка [19, 20, 65]. Вместе с тем в некоторых экспериментах наблюдали взаимодействие глобулярного домена гистона Н1 с основаниями ДНК в области большой бороздки [14, 20–22, 24]. Было показано, что связывание гистона Н1 приводит к некоторому нарушению конформации двойной спирали ДНК [25, 26, 28, 32]. Однако вплоть до настоящего времени нет прямых структурных данных для характеристики комплексов гистона Н1 с линкерной ДНК. Непрямые структурно-чувствительные методы, такие как круговой дихроизм в ультрафиолетовой области, оказываются неинформативными при изучении надмолекулярных структур в силу высокого

рассеяния растворов подобных комплексов, что проявляется в виде так называемого ψ -типа (PSI – Polymer and Salt Induced) спектров кругового дихроизма ДНК [14, 19–24, 66]. Такое состояние ДНК возникает при связывании не только с лизин-богатыми гистонами Н1, но и с катионными полипептидами и некоторыми другими ядерными белками [5, 14, 24–26, 28–30, 32, 67]. В случае взаимодействия ДНК с ядерными белками появление ψ -типа спектров кругового дихроизма ДНК обусловлено формированием надмолекулярных структур и эффектами рассеяния поляризованного света на крупных конденсированных частицах. При этом эксперименты по рентгеновскому рассеянию показали, что ДНК в этих случаях остается в В-форме [25, 68, 69].

Гистоны Н1 и Н5 способны избирательно и с высоким сродством взаимодействовать с участками ДНК, уже имеющими структурные нарушения: разнообразные перекрестные структуры [70], структуры типа хиазмы Холлидея [71], участки связывания ДНК с лекарственными препаратами [72, 73] и проч. Степень предпочтения гистона Н1 к связыванию с нуклеосомной ДНК выше по сравнению с его сродством к свободной ДНК по разным данным от двух-десяти [74] до 150 [1] раз. Столь существенный разброс может объясняться тем, что разные авторы использовали в своих исследованиях различные по длине участки ДНК в качестве модельной мишени связывания. Так, сродство Н1 к перекрестным структурам ДНК типа 4Н/4WJ (Four Way Junction) примерно в 100 раз выше, чем к линейной ДНК [1].

Важную роль во взаимодействиях с ДНК играет положительно заряженный С-концевой участок гистона Н1 [1, 75]. Как уже было отмечено ранее, основные функциональные различия между подтипами белка Н1, по мнению ряда авторов [1, 5, 6, 76–80], обусловлены вариативностью первичной структуры их С-концевого фрагмента. Это предположение находит свое подтверждение, в частности, на примере исследования взаимодействия ДНК со спермий-специфическими гистонами семейства Н1 [26–28, 32, 67]. Немаловажным представляется и то, что С-концевой участок сохраняется и в белках, родственных гистону Н1, но лишенных канонического глобулярного домена [81]. Характерной чертой С-концевого фрагмента является большое количество достаточно равномерно распределенных вдоль полипептидной цепи остатков лизина [81, 82], что способствует стабилизации комплексов ДНК–Н1 в хроматине. Согласно литературным данным, гистон Н1, лишенный N-концевой последовательности, конденсирует ДНК так же, как и интактная молекула [83]. Это служит косвенным подтверждением того, что в конденсации хроматина принимает активное участие именно С-кон-

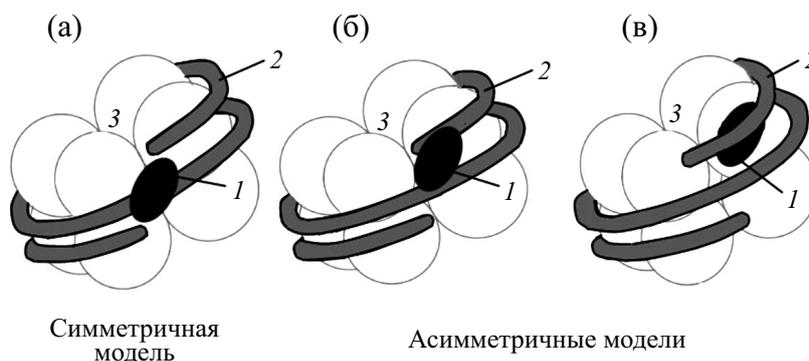


Рис. 2. Схематическое представление моделей возможной локализации глобулярного домена Н1 на нуклеосоме: симметричная (а) и асимметричные (б, в) модели; 1 — глобулярный домен гистона Н1; 2 — ДНК; 3 — гистоновый октамер.

цевой участок Н1 [36]. Именно этот фрагмент белка взаимодействует с ДНК и необходим для прочного связывания линкерных гистонов с нуклеосомой [84, 85]. При этом в пределах С-концевого фрагмента молекулы Н1 выделяют две области, разделенные коротким линкером [51, 78, 79]: область I — с 97-го по 121-й а.о., расположенная непосредственно за глобулярным доменом Н1, и область II — со 145-го по 169-й а.о. Интересно отметить, что удаление фрагментов 122–144 и 170–196 а.о. не приводит к изменениям функции С-концевого домена. Кроме того, исследование мутантных белков, в которых была проведена замена аминокислот со 122-го по 144-й и со 170-го по 196-й на последовательность 97–121, показало, что модифицированный белок ведет себя так же, как и белок дикого типа [51, 76].

Недавние исследования показали, что ДНК-связывающие свойства гистона Н1 сохраняются и при изменении очередности расположения аминокислот в С-концевом домене [84, 86, 87]. Таким образом, основными факторами в регуляции взаимодействия С-концевого домена Н1 с линкерной ДНК являются специфические аминокислотные остатки в этой области, т.е. определенный набор образующих его аминокислотных остатков, а не какая-либо конкретная аминокислотная последовательность [51, 75–77, 84, 85, 88]. Это означает, что для компактизации ДНК важно наличие определенных аминокислот, но не порядок их расположения.

Кроме С-концевого участка Н1 во взаимодействии с ДНК принимает участие и глобулярный домен. На основании проведенных экспериментов было предложено несколько моделей связывания линкерных гистонов с нуклеосомой (рис. 2). На сегодняшний день все предложенные модели можно разделить на модели симметричного и несимметричного связывания. Эти модели отличаются друг от друга расположением глобулы относительно оси симметрии нуклеосомы и дли-

ной участка ДНК, который закрыт белком от воздействия микрококковой нуклеазы. В симметричной модели [89] глобулярный домен расположен в центре нуклеосомы с внешней стороны, а N- и С-концевые фрагменты белка взаимодействуют с нуклеосомной ДНК и защищают по 10 п.н. с каждой стороны от точки ее входа/выхода из нуклеосомы (рис. 2). Согласно асимметричной модели [90, 91], ДНК защищена у оси симметрии по 15 и 5 п.н. с каждой стороны в месте входа/выхода ДНК из нуклеосомы. При этом глобула расположена на расстоянии 70 п.н. от оси симметрии таким образом, что она соединяет два витка спирали ДНК (рис. 2а). Согласно альтернативному варианту несимметричной модели [92, 93] глобулярный домен расположен между ДНК и нуклеосомой (рис. 2б). В этой модели 20 п.н. защищены только с одной стороны оси симметрии.

Основываясь на последних структурных исследованиях методами криоэлектронной микроскопии и ядерного магнитного резонанса, удалось подтвердить существование элементов хроматина, удовлетворяющих асимметричной модели связывания [84]. В дополнение к ранее описанным вариантам модели несимметричного связывания в этом случае глобулярный домен линкерного гистона, ДНК и коровая частица соединены мостиками и также несимметричным образом защищены 10 п.н. ДНК (так называемая «off-dyad» модель, рис. 3б). В глобулярном домене выделены три сайта связывания белка с ДНК, точное положение которых до сих пор не определено [84, 94]. Однако показано, что в каждом из них есть Arg74 [95]. Кроме того, показано, что в образовании комплекса гистона Н5 с нуклеосомой принимает участие и С-концевой домен гистона Н2А [84].

Таким образом, многочисленные исследования, посвященные взаимодействию гистона Н1 с нуклеосомой, позволяют сделать вывод, что возможно существование различных альтернатив-

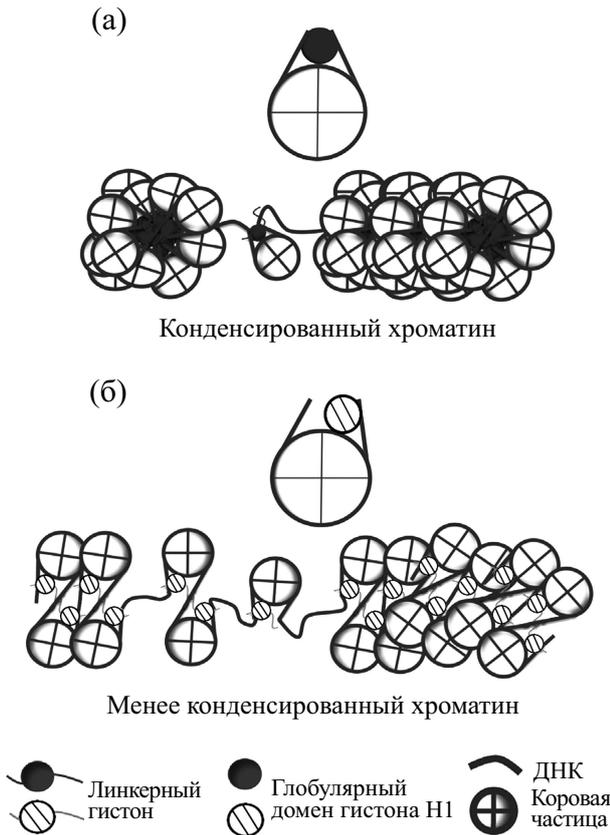


Рис. 3. Связывание нуклеосомной ДНК с глобулярным доменом гистона Н5, выделенного из эритроцитов курицы [56]. Рисунок представлен с любезного согласия авторов. (а) – Модель «on-dyad» связывания, соответствующая более конденсированному состоянию хроматина; (б) – модель «off-dyad» связывания, соответствующая менее конденсированному состоянию хроматина.

ных структур такого комплекса. В частности, эти конфигурации отличаются положением и ориентацией глобулярного домена линкерного гистона относительно самой нуклеосомы. Совсем недавно с помощью рентгеноструктурного анализа и метода ядерного магнитного резонанса удалось описать взаимодействие 165 п.н. нуклеосомной ДНК с глобулярным доменом гистона Н5, выделенного из эритроцитов курицы [56], с разрешением 3.5 Å. Надо отметить, что эта модель не противоречит моделям, описанным ранее. Авторы показали, что глобула гистона Н5 располагается на оси нуклеосомы и перекрывает оба плеча линкерной ДНК, демонстрируя симметричное («on-dyad») связывание (рис. 3а) [56].

Авторы моделей симметричного «on-dyad» (рис. 3а) и несимметричного «off-dyad» (рис. 3б) связывания предполагают, что первая из них относится к случаю разрыхленного состояния хроматина, а вторая описывает конденсированный хроматин [56].

Структура гистонов Н1 и Н5 очень схожа (гомология Н5 курицы с Н1.0 мыши составляет ~88%), и можно ожидать, что и связывание этих белков с ДНК будет проходить схожим образом. Несмотря на то что концевые участки линкерного гистона не играют важной роли в позиционировании глобулы в хроматосоме, высокий положительный заряд N-концевого домена может стабилизировать связывание белка с ДНК. Вероятнее всего, существуют несколько различных механизмов, подобных описанным выше, посредством которых линкерные гистоны формируют структуры хроматина высшего порядка.

Несмотря на то что и глобулярный домен гистона Н1, и его С-концевой участок отвечают за связывание с ДНК, их функции при этом совершенно различны. Глобулярный домен служит якорем при взаимодействии гистона с линкерной ДНК. Этот домен имеет по меньшей мере два сайта связывания с ДНК: основной сайт расположен со стороны большой бороздки суперспирали ДНК, а второй – с внутренней стороны малой вблизи оси симметрии. Наличие таких разделенных в пространстве сайтов взаимодействия с ДНК отчетливо проявляется при связывании гистона Н1 с перекрестными или деформированными участками ДНК [70–73], а также при связывании линкерного гистона в точке входа/выхода из нуклеосомы. Обнаруженные в С-концевой последовательности S/TPKK-мотивы (Ser/Thr-Pro-Lys-Lys) отвечают за способность этого участка изгибать ДНК при ее взаимодействии с Н1 и тем самым модулировать геометрию двойной спирали ДНК в хроматине. По всей видимости, глобулярный домен может рассматриваться как независимый нуклеосома-связывающий домен.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИНКЕРНОГО ГИСТОНА Н1 С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

В состав хроматина помимо гистонов входит большое количество разнообразных негистоновых белков. Гистон Н1 иногда относят к природно неупорядоченным белкам [36, 69, 82], способным взаимодействовать со множеством разнообразных партнеров. Взаимодействия Н1 с другими белками оказываются существенными для формирования высших уровней структурной организации хроматина [63, 96]. Белки, взаимодействующие с гистоном Н1, можно условно разделить на несколько категорий. Среди них белки, принимающие участие в сплайсинге; в процессах, связанных с распознаванием повреждений ДНК; в транскрипции и трансляции; выступающие в качестве шаперонов для коровых гистонов при сборке/разборке нуклеосомной частицы [77].

Специфическое связывание Н1 с белками было продемонстрировано с помощью различных

методов. Сочетание метода иммунопреципитации и масс-спектрометрического анализа позволило выявить белки, специфически взаимодействующие с H1 [97]. Среди них компоненты рибосомальных субъединиц 40S и 60S, а также некоторые ядерные рибонуклеопротеиды. Было показано, что взаимодействие гистона с этими белками вызывает подавление транскрипции некоторых генов. На сегодняшний день с помощью масс-спектрометрии в ядре и ядрышке выявлено более сотни белков, которые прямо или косвенно взаимодействуют с H1.0 [77]. Установлено, что гистон H1 является ключевым белком, необходимым для формирования канонической структуры ядрышка и для его функционирования [98]. Кроме того, H1 может быть участником более крупных макромолекулярных белок-белковых комплексов.

Хорошо известно, что линкерный гистон H1 может быть медиатором транскрипции [77, 99]. При этом он способен выступать как в качестве репрессора специфической геновой транскрипции [96, 97, 100, 101], так и в качестве активатора транскрипционных процессов [77, 80, 102, 103]. Недавние исследования показали, что H1 играет важную роль в эпигенетических процессах [104]. Например, снижение уровня экспрессии H1.2, H1.3 и H1.4 в клетках приводит к понижению уровня метилирования ДНК [62, 104]. Согласно литературным данным, H1.0 связывается с рядом белков, принимающих непосредственное участие в процессах репарации ДНК [62, 77]. К ним относятся белки Ku70 и Ku86, валозинсодержащий белок VCP и др. Взаимодействие гистона H1.0 с этими белками приводит к сильному уплотнению хроматина и тем самым способствует защите поврежденных участков.

Одними из первых белков, для которых была показана способность взаимодействовать с линкерными гистонами, являются представители большого семейства ядерных белков с высокой электрофоретической подвижностью — HMG-белки (High Mobility Group). Первая группа — белки HMGN (ранее известные как HMG14/17). Эти белки, формируя гетеродимерный комплекс, взаимодействуют с нуклеосомой и облегчают транскрипцию, но при этом не являются частью транскрипционного комплекса [105]. Взаимодействию линкерного гистона H1 с белками данной группы в процессах ремоделирования структуры хроматина способствует близкое расположение глобулярных доменов HMGN и H1 [106]. Не исключено, что имеет место конкуренция между HMGN белками и H1 за участок связывания с ДНК [107]. В частности, показано, что конкуренция между гистонами H1 и HMGN белками за связывание с АТ-богатыми участками влияет на компактизацию хроматина [108]. В активно транскрибируемых генах обогащение некоторых

участков белком HMGN сопровождается истощением H1 [109, 110]. Белок HMGN снижает уровень компактизации хроматина, вызванной гистонами H1, и стимулирует транскрипцию [111]. Совсем недавно было установлено, что белки группы HMGN оказывают непосредственное влияние на стабилизацию высокоупорядоченной структуры хроматина и на взаимодействие концевых участков гистонов с ДНК [112].

Вторая группа HMG белков, взаимодействующих с линкерными гистонами, — это самые распространенные и наиболее изученные на сегодняшний день негистоновые белки хроматина — HMGB-доменные белки (HMGB1/2) [113–115]. HMGB-белки имеют в своем составе гомологичные структурно-консервативные ДНК-связывающие домены (так называемые HMGB-домены). Представителями сайт-специфичных однодоменных HMGB-белков являются транскрипционные факторы TCF и LEF-1 [116], белки, определяющие пол SRY и SOX [117–120], факторы перестройки хроматина BAF57 и PB1 [121–123] и т. д. Среди многодоменных белков данного семейства можно выделить белки HMGB1-4 [113–115, 122, 124, 125], митохондриальные факторы mtTF1 и ABF2 [122], транскрипционный фактор РНК-полимеразы I UBF [126] и т. д.

Как и гистоны H1, белки HMGB1 и HMGB2 взаимодействуют с линкерным участком ДНК [113, 127] в точке входа/выхода ее из нуклеосомы и могут выступать как в качестве конкурентов, так и в качестве партнеров при связывании с ДНК [128]. Имеющиеся экспериментальные данные указывают, что связывание одного из белков с ДНК стимулирует связывание с ней и второго [14, 20, 22, 24, 66]. При их одновременном присутствии в комплексе с ДНК положительно заряженный гистон H1 взаимодействует преимущественно с фосфатными группами ДНК и С-концевым доменом HMGB1, экранируя их отрицательные заряды и стабилизируя образующиеся надмолекулярные ДНК-белковые комплексы [14, 24]. Исследования структуры комплекса, образованного ДНК с гистонами H1 в присутствии HMGB1 [14, 24, 66, 130], показали, что наблюдается связывание индивидуальных белков как с сахарофосфатным остовом, так и с основаниями ДНК [14, 19, 66]. Методом атомной силовой микроскопии было показано, что в комплексе HMGB1/H1 с ДНК наблюдается формирование фибрилло-подобных структур, каждая из которых образована несколькими молекулами ДНК [14, 66, 131]. При этом белковые молекулы связывают друг с другом индивидуальные молекулы ДНК в фибрилле. Множественные белок-белковые и ДНК-белковые взаимодействия делают такие структуры весьма стабильными.

В других работах [130, 132, 133] было продемонстрировано взаимодействие Н1 с НМGB1 (в отсутствие ДНК) *in vitro*. Прямое взаимодействие двух белков было также показано методами кругового дихроизма и динамического светорассеяния [134], а также флуоресцентными методами [34, 35]. Взаимодействие двух белков приводит к изменению структуры как минимум одного из них: увеличивается доля α -спиральных участков, что вызывает небольшие изменения третичной структуры [35, 134]. Возможность взаимодействия между гистоном Н1 и белком НМGB1 посредством их С-концевых участков также была показана с использованием малоуглового рентгеновского рассеяния и метода ядерного магнитного резонанса [130]. В некоторых работах указывается на то, что результат взаимодействия двух белков может зависеть от редокс-состояния (от англ. redox – reduction/oxidation) остатков цистеина белка НМGB1 [114, 135]. Восстановленная форма НМGB1 легко вытесняет гистон Н1 с ДНК, в то время как связывание белка в окисленном состоянии заметно ограничивает мобильность обоих белков в хроматине [114].

Имеющиеся на сегодняшний день экспериментальные данные указывают, что взаимодействие гистона Н1 с другими белками происходит в основном за счет его С-концевого участка [60, 77, 97, 136]. В недавних экспериментах было показано, что удаление С-концевого участка приводит к потере примерно 25% обнаруженных в ядре взаимодействий Н1.0 с другими белками [60]. Полагают, что, связываясь с другими белками, гистон Н1 экранирует отрицательный заряд молекулы-партнера и тем самым облегчает ее взаимодействие с ДНК. Недавние исследования белка Н1.0 показали возможность участия во взаимодействии с другими белками и его глобулярного фрагмента [60]. Авторы предполагают, что влияние каждого из трех функциональных доменов Н1 на его связывание с другими белками отвечает за специфическое взаимодействие с большинством из них. Структурная неупорядоченность N- и С-концевых доменов может облегчать конкретные белок-белковые взаимодействия. Однако в целом вопросы о влиянии этих областей на взаимодействие Н1 с различными белками остаются открытыми.

Связывание различных подтипов гистона Н1 с хроматином носит динамический характер. Основным фактором, определяющим характер этого связывания, является длина С-концевого фрагмента белка: наименьшая продолжительность пребывания на нуклеосоме выявлена для Н1 с самым коротким С-концевым участком [87]. Величина промежутка времени, когда Н1 связан с нуклеосомой, регулирует степень конденсации хроматина и его доступность для других белков, а также возможность прохождения процессов ре-

моделирования хроматина [137]. Кроме того, время связывания Н1 с нуклеосомой влияет и на возможность доступа к ДНК транскрипционных факторов и других ядерных белков [138]. НМGB-белки также мобильны, время пребывания на нуклеосоме этих белков, так же как и гистона Н1, непродолжительно [128]. Однако Н1 значительно дольше находится на нуклеосоме по сравнению со всеми представителями белков НМG-семейства [139–141]. Учтывая, что взаимодействие между Н1 и НМG происходит в течение довольно короткого времени, достаточно трудно установить, какое именно биологическое значение имеет конкретное взаимодействие НМG-белков с гистоном Н1. Вполне вероятно, что эти взаимодействия также оказывают определенное влияние на конкретный ген или ткань [139, 140]. Предполагается, что ряд биологических эффектов напрямую связан с взаимодействиями между Н1 и НМG-белками [128]. Однако вопрос о том, как связывание между конкретными вариантами Н1 и НМG-белков влияет на структуру и биологические функции генома, остается открытым по настоящее время.

Не стоит забывать и о посттрансляционных модификациях гистона Н1, которые также могут модулировать ДНК-белковые и белок-белковые взаимодействия (подробнее см. в первой части обзора [36]). Кроме того, обратимые изменения в состояниях модификаций гистонов влияют на структуру хроматина в целом [142]. Например, метилирование лизина 26 в Н1.4 способствует его взаимодействию с гетерохроматиновым белком HP1, что приводит к формированию областей хроматина с пониженным уровнем транскрипции [143]. Деметилирование лизина 26 в Н1.4 способствует блокированию данного белок-белкового взаимодействия и, следовательно, приводит к активации транскрипционной активности, а одновременное фосфорилирование соседнего остатка серина в 27-м положении сводит его на нет [144].

С точки зрения функциональной значимости вопросы взаимодействия гистона Н1 с другими белками остаются плохо изученными и требуют дальнейшего тщательного исследования. Многочисленные контакты с другими белками хроматина позволяют предположить, что функции гистона Н1 в ядре гораздо шире, чем только компактизация ДНК [60]. Сегодня можно с уверенностью говорить, что многофункциональность линкерного гистона по крайней мере частично обусловлена его взаимодействием с множеством ядерных и ядерных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Несмотря на активные исследования структуры хроматина, проводимые на протяжении по-

следних десятилетий, можно сказать, что на сегодняшний день сформировано достаточно ясное представление лишь о структуре нуклеосомы — первого уровня компактизации хроматина. Имеющиеся к настоящему времени сведения о структуре хроматина на следующих, более высоких уровнях структурной организации, зачастую довольно противоречивы и до сих пор не позволяют сформировать однозначную картину. С появлением новых методов исследования биологических молекул (флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) [145, 146], высокоскоростная атомная силовая микроскопия, спектроскопия поглощения и оптической активности в инфракрасной области (VCD и ROA) [88, 131, 147–150], малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние (SAXS и SANS) [59, 145, 146, 150–152] и многие другие) быстро увеличивается и объем доступной структурной информации. Порой, некоторые высказанные ранее гипотезы, требуют пересмотра и дополнительной экспериментальной проверки. Наиболее ярко, на наш взгляд, это иллюстрируется недавними данными о структуре 30-нанометровой фибриллы [3, 56, 152–157].

30-нанометровая фибрилла — одна из наиболее интенсивно изучавшихся форм компактного хроматина *in vitro* [158]. Согласно общепринятым представлениям, 10-нанометровая цепочка нуклеосом складывается в спиральные структуры диаметром 30 нм, а затем уплотняется до размера от 120 до 300–700 нм и в результате формируются митотические хромосомы. Авторы ряда работ [17, 63, 159] указывают на то, что образование 30-нанометровой фибриллы является необходимым условием для сборки и стабилизации конденсированных интерфазных и митотических хромосом. В ядрах некоторых терминально дифференцированных клеток выявлены хорошо различимые 30-нанометровые фибриллы [160–162], что указывает на роль таких структур в транскрипционно неактивном хроматине. Однако следует отметить, что непосредственно *in vivo* во многих ядрах эукариотических клеток [163–165], в частности в интактных клетках млекопитающих [152, 163, 164], такие фибриллы до сих пор не описаны. Нуклеосомы могут не складываться в фибриллу со строгой структурой диаметром в 30 нм, а взаимодействия между отдаленными нуклеосомами могут привести к образованию менее регулярной полимерной структуры [41–43, 153, 165–168].

Не исключено, что 30- и 120-нанометровые структуры свойственны определенным типам клеток. В последнее время некоторыми авторами было показано, что хроматин некоторых типов клеток существует преимущественно в виде волокон диаметром 10 нм [169] или гетерогенных групп нуклеосом, которые связаны с линкерным

гистоном [167]. В 2015 г. *in vivo* были проведены исследования хроматиновой фибриллы на уровне единичной клетки с разрешением ~20 нм с помощью метода STORM-микроскопии (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [167]. Авторы показали, что нуклеосомы собираются в группы разного размера — «муфты нуклеосом». При этом в дифференцированных фибробластах человека обнаружено порядка восьми нуклеосом в «муфте», в то время как в стволовых клетках — порядка четырех нуклеосом. Вероятно, хроматиновые фибриллы толщиной 30 нм существуют в виде коротких фрагментов [62], что вполне согласуется с результатами исследований некоторых авторов, которые показали, что в природном хроматине нет регулярных 30-нанометровых фибрилл хроматина [168–171]. На организацию и динамику таких групп нуклеосом оказывают существенное влияние различные взаимодействия, в том числе и нуклеосом-нуклеосомные [8]. Интерфазные хромосомы могут быть организованы в глобулярные структуры — топологически ассоциированные домены (TAD) [41, 168], которые сохраняются в течение всего клеточного цикла [166]. Сегодня в литературе рассматривается модель, согласно которой в метафазных хромосомах хроматин находится в состоянии «жидкой капли» [166]. Однако такая модель не в состоянии объяснить существование структурированной метафазной хромосомы. В качестве альтернативы существующим представлениям недавно была предложена модель двухфазной фрактальной структуры хроматина, которая позволяет описать и компактизацию ДНК и динамику хроматина ([172], более подробно в обзоре [11]).

На основе результатов, полученных с помощью метода EMANIC (Electron Microscopy-Assisted Nucleosome Interaction Capture), был сделан вывод, что не существует единого типа спиральной организации 30-нанометровой фибриллы в хроматине. Это может быть связано с тем, что структура хроматиновой фибриллы в значительной степени зависит от длины линкерной ДНК [3, 173]. Регулярные зигзагообразные структуры («two-start helix») образуются в случае коротких и средних длин линкерного участка ДНК (173–209 п.н.). В то же время структуре 30-нанометровой фибриллы в хроматине с большей длиной линкера (218–226 п.н.) лучше соответствует модель соленида. В обсуждаемой в литературе модели гетероморфной 30-нанометровой фибриллы идет чередование участков со структурой соленида с элементами зигзагообразной модели [3, 63]. Таким образом, задача адекватного описания высших уровней структурной организации хроматина до сих пор далека от своего решения и требует дальнейшего тщательного исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01500 (структурные исследования ДНК-белковых взаимодействий) и грант № 18-04-01199 (исследование роли ядерных белков HMGB1/2, H1 в структурной организации хроматина)).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. E. White, A. R. Hieb, and K. Luger, *Sci. Rep.* **6**, 19122 (2016).
2. C. L. Woodcock, and R. P. Ghosh, *Gold Spring Harb Perspect. Biol.*, a000296 (2010).
3. K. Luger, M. L. Dechassa, and D. J. Tremethick, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 436 (2012).
4. T. L. Caterino, and J. J. Hayes, *Biochem. Cell Biol.* **89**, 35 (2011).
5. E. Chikhirzhina, G. Chikhirzhina, and A. Polyanichko, *Biomed. Spectr. Imag.* **3**, 345 (2014).
6. Е. В. Чихиржина и В. И. Воробьев, *Цитология* **44**, 721 (2002).
7. S. A. Grigoryev, G. Arya, S. Correll, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13317 (2009).
8. A. Kalashnikova, M. Porter-Goff, U. Muthurajan, et al., *J. Roy. Soc. Interface* **10**, 20121022 (2013).
9. J. Ausio, *Bioessays* **37**, 46 (2015).
10. A. Sadakierska-Chudy and M. Filip, *Neurotox. Res.* **27**, 172 (2015).
11. А. В. Илатовский, Д. В. Лебедев, М. В. Филатов и др., *Цитология* **54** (4), 298 (2012).
12. A. L. Olins and D. E. Olins, *Science* **184**, 868 (1974).
13. H. Schiessel, J. Widom, R. F. Bruinsma, et al., *Phys. Rev. Lett.* **86**, 4414 (2001).
14. A. M. Polyanichko and E. V. Chikhirzhina, *J. Mol. Struct.* **1044**, 167 (2013).
15. K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, et al., *Nature* **389**, 251 (1997).
16. R. K. Suto, R. S. Edayathumangalam, C. L. White, et al., *J. Mol. Biol.* **326**, 371 (2003).
17. T. Schalch, S. Duda, D. F. Sargent, et al., *Nature* **436**, 138 (2005).
18. A. Klug, *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 1 (2010).
19. A. Polyanichko and H. Wieser, *Biopolymers* **78**, 329 (2005).
20. A. Polyanichko, E. Chikhirzhina, V. Andruschchenko, et al., *Biopolymers* **83**, 182 (2006).
21. A. Polyanichko and H. Wieser, in *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Vibrational Spectroscopy*, ed. by E. Permyakov and V. Uversky (Nova Science Publishers, Inc., N.-Y., 2007), pp. 267–302.
22. A. Polyanichko and E. Chikhirzhina, *Spectroscopy* **27**, 393 (2012).
23. А. М. Polyanichko, V. V. Andrushchenko, P. Bour, et al., *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy*, ed. by D. S. Rodgers (Nova Science Publishers, N.-Y., 2012), pp. 67–126.
24. А. М. Поляничко, В. И. Воробьев и Е. В. Чихиржина, *Молекуляр. биология* **47** (2), 338 (2013).
25. J. Zlatanova and J. Yaneva, *DNA Cell Biol.* **10**, 239 (1991).
26. Е. В. Чихиржина, Т. Ю. Старкова, Е. И. Костылева и др., *Цитология* **53** (10), 826 (2011).
27. Е. И. Рамм, Е. В. Чихиржина, Е. И. Костылева и др., *Биохимия* **60** (1), 150 (1995).
28. Е. В. Чихиржина, Е. И. Костылева, Е. И. Рамм и др., *Цитология* **40** (10), 883 (1998).
29. А. М. Поляничко, С. Г. Давыденко, Е. В. Чихиржина и др., *Цитология* **42** (8), 787 (2000).
30. Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко, А. Н. Скворцов и др., *Молекуляр. биология* **36** (3), 525 (2002).
31. А. М. Polyanichko, E. V. Chikhirzhina, A. N. Skvortsov, et al., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **19**, 1053 (2002).
32. E. Chikhirzhina, T. Starkova, E. Kostyleva, et al., *Spectroscopy: Int. J.* **27**, 433 (2012).
33. Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко, Е. И. Костылева и др., *Молекуляр. биология* **45** (2), 356 (2011).
34. А. В. Фонин, О. В. Степаненко, К. К. Туровец и др., *Цитология* **52** (11), 946 (2010).
35. A. Fonin, O. V. Stepanenko, I. M. Kuznetsova, et al., *Spectroscopy* **24**, 165 (2010).
36. Е. Чихиржина, Т. Старкова и А. Поляничко, *Биофизика* **63**, 1070 (2018).
37. J. B. Baldwin, P. G. Boseley, E. M. Bradbury, et al., *Nature* **253**, 245 (1975).
38. R. D. Kornberg, *Science* **184**, 868 (1974).
39. C. L. Peterson and M. A. Laniel, *Curr. Biol.* **14**, R546 (2004).
40. C. A. Davey, D. F. Sargent, K. Luger, et al., *J. Mol. Biol.* **319**, 1097 (2002).
41. S. Bilokapic, M. Strause, and M. Halic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 101 (2018).
42. S. Bilokapic, M. Strause, and M. Halic, *Nat. Commun.* **9**, 1330 (2018).
43. S. Bilokapic, M. Strauss, and M. Halic, *Sci. Rep.* **8**, 7046 (2018).
44. G. Arents, R. W. Burlingame, B. C. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148 (1991).

45. J. M. Harp, B. L. Hanson, D. E. Timm, et al., *Acta Cryst. D: Biol. Cryst.* **56**, 1513 (2000).
46. C. M. Wood, J. M. Nicholson, S. J. Lambert, et al., *Acta Cryst. Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Comm.* **61**, 541 (2005).
47. A. Jerzmanowski, in *Chormatin Struture and Dynamics: State-of-the-Art*, ed. by J. Zlatanova and S. H. Leuba (Elsevier, London, 2004), pp. 75–102.
48. B. Sarg, W. Helliger, H. Talasz, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 6573 (2006).
49. A. Kowalski and J. Palyga, *Cell Biol. Int.* **36**, 981 (2012).
50. J. Ocampo, F. Cui, V. B. Zhurkin, and D. J. Clark, *Nucleus* **7**, 382 (2016).
51. X. Lu and J. C. Hansen, *J. Biol. Chem.* **279**, 8701 (2004).
52. C. Crane-Robinson, *Biochim. Biophys. Acta* **1859**, 431 (2016).
53. D. J. Tremethick, *Cell* **128**, 651 (2007).
54. G. Li and D. Reinberg, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 175 (2011).
55. D. Angelov, J. Vitolo, V. Mutskov, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6599 (2001).
56. B. R. Zhou, J. Jiang, H. Feng, et al., *Mol. Cell* **59**, 628 (2015).
57. B. R. Zhou, H. Feng, R. Ghirlando, et al., *J. Mol. Biol.* **428**, 3948 (2016).
58. J. Bednar, I. Garcia-Saez, R. Boopathi, et al., *Mol. Cell*, **66**, 384 (2017).
59. K. Maeshima, R. Imai, T. Hikima, et al., *Methods* **70**, 154 (2014).
60. A. A. Kalashnikova, D. D. Winkler, S. J. McBryant, et al., *Nucl. Acids Res.* **41**, 4026 (2013).
61. P. Zhu and G. Li, *IUBMB Life* **68**, 873 (2016).
62. D. V. Fyodorov, B. R. Zhou, A. I. Skoultchi, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 192 (2018).
63. P. J. Robinson and D. Rhodes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 336 (2006).
64. P. J. Robinson, L. Fairall, A. T. Van Huynh, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 6506 (2006).
65. V. Andrushchenko, J. H. van de Sande, and H. Wieser, *Biopolymers* **72**, 374 (2003).
66. A. Polyanichko, and E. Chikhirzhina, *Adv. Biomed. Spect.* **7**, 185 (2013).
67. E. Chikhirzhina, T. Starkova, E. Kostyleva et al., *Adv. Biomed. Spectr.* **7**, 177 (2013).
68. T. Maniatis, J. H. Venable Jr., and L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **84**, 37 (1974).
69. A. L. Turner, M. Watson, O. G. Wilkins, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pii: 201805943 (2018).
70. F. Totsingan and A. J. Bell Jr., *Prot. Sci.* **22**, 1552 (2013).
71. J. Zlatanova and K. van Holde, *BioEssays* **20**, 584 (1998).
72. J. N. Yaneva, E. G. Paneva, S. I. Zacharieva et al., *Z. Naturforsch C* **61**, 879 (2006).
73. J. N. Yaneva, E. G. Paneva, S. I. Zacharieva et al., *Z. Naturforsch C* **62**, 905 (2007).
74. K. P. Nightingale, D. Pruss, and A. P. Wolffe, *J. Biol. Chem.* **271**, 7090 (1996).
75. X. Lu and J. C. Hansen, *Biochem. Cell Biol.* **81**, 173 (2003).
76. X. Lu, B. Hamkalo, M. H. Parseghian, et al., *Biochemistry* **48**, 164 (2009).
77. A. A. Kalashnikova, R. A. Rogge, and J. C. Hansen, *Biochim. Biophys. Acta* **1859**, 455 (2016).
78. A. Roque, I. Ponte, and P. Suau, *Chromosoma* **126**, 83 (2017).
79. A. Roque, I. Ponte, and P. Suau, *Biochim. Biophys. Acta* **1859**, 444 (2016).
80. A. Roque, I. Ponte, J. L. Arrondo, et al., *Nucl. Acids Res.* **36**, 4719 (2008).
81. H. E. Kasinsky, J. D. Lewis, J. B. Dacks, et al., *FASEB J.* **15**, 34 (2001).
82. J. C. Hansen, X. Lu, E. D. Ross, et al., *J. Biol. Chem.* **281**, 1853 (2006).
83. J. Allan, D. Ram, N. Harborne, et al., *J. Cell. Biol.* **98**, 1320 (1984).
84. B. R. Zhou, H. Feng, H. Kato, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 19390 (2013).
85. M. J. Hendzel, M. A. Lever, E. Crawford, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 20028 (2004).
86. N. Raghuram, G. Carrero, J. Th'ng et al., *Biochem. Cell Biol.* **87**, 189 (2009).
87. J. P. Th'ng, R. Sung, M. Ye et al., *J. Biol. Chem.* **280**, 27809 (2005).
88. H. Fang, D. J. Clark, and J. J. Hayes, *Nucl. Acids Res.* **40**, 1475 (2012).
89. J. Allan, P. G. Hartman, C. Crane-Robinson, et al., *Nature* **288**, 675 (1980).
90. Y. Zhou, S. Gershman, V. Ramakrishnan, et al., *Nature* **395**, 402 (1998).
91. S. Lambert, S. Muyldermans, J. Baldwin, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 810 (1991).
92. J. Hayes, *Biochemistry* **35**, 11931 (1996).
93. D. Pruss, B. Bartholomew, J. Persinger, et al., *Science* **274**, 614 (1996).
94. D. T. Brown, T. Izard, and T. Misteli, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 250 (2006).
95. L. Fan and V. A. Roberts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8384 (2006).
96. S. J. McBryant, X. Lu, and J. C. Hansen, *Cell Res.* **20**, 519 (2010).
97. J.-Q. Ni, L.-P. Liu, D. Hess, et al., *Genes Dev.* **20**, 1959 (2006).
98. H. J. Szerlong, J. A. Herman, C. M. Krause et al., *J. Mol. Biol.* **427**, 2056 (2015).
99. J. Zlatanova, *Trends Biochem. Sci.* **15**, 273 (1990).

100. H. Lee, R. Habas, and C. Abate-Shen, *Science* **304**, 1675 (2004).
101. P. J. Laybourn and J. T. Kadonaga, *Science* **254**, 238 (1991).
102. Q. Lin, A. Inselman, X. Han, et al., *J. Biol. Chem.* **279**, 23525 (2004).
103. Y. Zheng, S. John, J. J. Pesavento, et al., *J. Cell Biol.* **189**, 407 (2010).
104. S. Yang, B. J. Kim, L. N. Toro, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 1708 (2013).
105. Y. V. Postnikov, L. Trieschmann, A. Rickers, et al., *J. Mol. Biol.* **252**, 423 (1995).
106. Y. Postnikov and M. Bustin, *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 62 (2010).
107. H. Kato, H. van Ingen, B. R. Zhou, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 12283 (2011).
108. R. D. Phair, P. Scaffidi, C. Elbi, et al., *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6393 (2004).
109. Y. V. Postnikov, V. V. Shick, A. V. Belyavsky, et al., *Nucl. Acids Res.* **19**, 717 (1991).
110. T. Deng, Z. I. Zhu, S. Zhang, et al., *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3377 (2013).
111. H. F. Ding, M. Bustin, and U. Hansen, *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5843 (1997).
112. K. J. Murphy, A. R. Cutter, H. Fang, et al., *Nucl. Acids Res.* **45**, 9917 (2017).
113. M. Stros, *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 101 (2010).
114. M. Stros, E. Polanska, M. Kucirek, et al., *PLoS One* **10**, e0138774 (2015).
115. R. Reeves, *DNA Repair* **36**, 122 (2015).
116. F. A. Atcha, A. Syed, B. Wu, et al., *Mol Cell Biol.* **27**, 8352 (2007).
117. L. H. Pevny and S. K. Nicolis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 421 (2010).
118. P. Bernard and V. R. Harley, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 400 (2010).
119. F. Oppel, N. Müller, G. Schackert, et al., *Mol Cancer* **10**, 137 (2011).
120. O. Leis, A. Eguiara, E. Lopez-Arribillaga, et al., *Oncogene* **31**, 1354 (2012).
121. T. Chi, *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 965 (2004).
122. M. Stros, D. Launholt, and K. D. Grasser, *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2590 (2007).
123. D. Lai, M. Wan, J. Wu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1169 (2009).
124. R. Catena, E. Escoffier, C. Caron, et al., *Biol. Reprod.* **80**, 358 (2009).
125. S. Park and S. J. Lippard, *Biochemistry* **51**, 6728 (2012).
126. G. J. Sullivan and B. McStay, *Nucl. Acids Res.* **26**, 3555 (1998).
127. V. Ramakrishnan, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 83 (1997).
128. Y. V. Postnikov and M. Bustin, *BBA* **1859**, 462 (2016).
129. А. М. Поляничко, З. В. Леоненко, Д. Крамб и др., *Биофизика* **53** (3), 407 (2008).
130. L. Cato, K. Stott, M. Watson, et al., *Mol. Biol.* **384**, 1262 (2008).
131. A. Polyanychko and H. Wieser, *Spectroscopy* **24**, 239 (2010).
132. L. A. Kohlstaedt, E. C. Sung, A. Fujishige, et al., *J. Biol. Chem.* **262**, 524 (1987).
133. L. A. Kohlstaedt and R. D. Cole, *Biochemistry* **33**, 570 (1994).
134. А. М. Поляничко, Б. А. Дрибинский, И. Б. Кипенко и др., *Структура и динамика молекулярных систем* **8А**, 3 (2010).
135. E. Polanska, S. Pospisilova, and M. Stros, *PLoS One* **9**, e89070 (2014).
136. P. Widlak, M. Kalinowska, M. H. Parseghian, et al., *Biochemistry* **44**, 7871 (2005).
137. S. W. Harshman, N. L. Young, M. R. Parthun, et al., *Nucl. Acids Res.* **41**, 9593 (2013).
138. E. Cheung, A. S. Zarifyan, and W. L. Kraus, *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2463 (2002).
139. R. D. Phair and T. Misteli, *Nature* **404**, 604 (2000).
140. M. Harrer, H. Luhrs, M. Bustin, et al., *J. Cell Sci.* **117**, 3459 (2004).
141. F. Catez, H. Yang, K. J. Tracey, et al., *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4321 (2004).
142. A. Allahverdi, R. Yang, N. Korolev, et al., *Nucl. Acids Res.* **39**, 1680 (2011).
143. P. Trojer, J. Zhang, M. Yonezawa, et al., *J. Biol. Chem.* **284**, 8395 (2009).
144. T. K. Hale, A. Contreras, A. J. Morrison, et al., *Mol. Cell* **22**, 693 (2006).
145. M. Brehove, T. Wang, J. North, et al., *J. Biol. Chem.* **290**, 22612 (2015).
146. R. Morra, T. Fessl, Y. Wang, et al., *Methods Mol. Biol.* **1431**, 175 (2016).
147. I. H. McColl, E. W. Blanch, A. C. Gill, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10019 (2003).
148. F. Zhu, N. W. Isaacs, L. Hecht, et al., *Structure* **13**, 1409 (2005).
149. L. D. Barron, *Biomed. Spectr. Imag.* **4**, 223 (2015).
150. M. L. Mello and B. C. Vidal, *PLoS One* **7**, e43169 (2012).
151. H. B. Stuhmann, *Acta Crystallogr. A* **64**, 181 (2008).
152. Y. Joti, T. Hikima, Y. Nishino, et al., *Nucleus* **3**, 404 (2012).
153. I. Garcia-Saez, H. Menoni, R. Boopathi, et al., *Mol. Cell* **72**, 1 (2018).
154. M. A. Ozturk, V. Cojocar, and R. C. Wade, *Structure* **26**, 1 (2018).
155. M. A. Ozturk, V. Cojocar, and R. C. Wade, *Biophys. J.* **114**, 2363 (2018).
156. B. R. Zhou, J. Jiang, R. Ghirlando, et al., *J. Mol. Biol.* **430**, 3093 (2018).

157. M. A. Ozturk, G. V. Pachov, R. C. Wade, et al., *Nucl. Acids Res.* **44**, 6599 (2016).
158. J. C. Hansen, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361 (2002).
159. F. Song, P. Chen, D. Sun, et al., *Science* **344**, 376 (2014).
160. C. L. Woodcock, *J. Cell Biol.* **125**, 11 (1994).
161. C. Kizilyaprak, D. Spehner, D. Devys, et al., *PLoS One* **5**, e11039 (2010).
162. M. P. Scheffer, M. Eltsov, and A. S. Frangakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 16992 (2011).
163. M. Eltsov, K. M. Maclellan, K. Maeshima et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19732 (2008).
164. E. Fussner, M. Strauss, U. Djuric, et al., *EMBO Rep.* **13**, 992 (2012).
165. H. D. Ou, S. Phan, T. J. Deerinck, et al., *Science* **357**, pii: eaag0025 (2017).
166. T. Nozaki, R. Imai, M. Tanbo, et al., *Mol. Cell* **67**, 282 (2017).
167. M. A. Ricci, C. Manzo, M. F. Garcí'a-Parajo, et al., *Cell* **160**, 1145 (2015).
168. K. Maeshima, R. Rogge, S. Tamura, et al., *EMBO J.* **35**, 1115 (2016).
169. K. Maeshima, R. Imai, S. Tamura, et al., *Chromosoma* **123**, 225 (2014).
170. S. A. Grigoryev, G. Bascom, J. M. Buckwalter, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 1238 (2016).
171. W. Li, P. Chen, J. Yu, et al., *Mol Cell* **64**, 120 (2016).
172. A. Bancaud, S. Huet, N. Daigle, et al., *EMBO J.* **28**, 3785 (2009).
173. A. Routh, S. Sandin, and D. Rhodes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8872 (2008).

The Role of the Linker Histones in Chromatin Structural Organization.

2. The Interactions with DNA and Nuclear Proteins

E.V. Chikhirzhina*, T.Yu. Starkova*, and A.M. Polyanichko*, **

**Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp. 4, St. Petersburg, 194064 Russia*

***St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

In the first part of our review (Biophysics, 63, 858 (2018)) we analyzed a structure of the linker histones of the H1 family, their post-translational modifications, and the role of the histone H1 in the formation of compact transcriptionally inactive chromatin. In the second part of the review, we describe the current understanding of the role of the linker histones in structural organization of chromatin: from nucleosomes to metaphase chromosomes. The various aspects of interactions of the linker histone H1 with other elements of chromatin, including DNA and nuclear proteins, are discussed.

Keywords: DNA, core histones, linker histone H1, nucleosome, chromatin structure, HMG proteins

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИИ ИЗМЕНЕНИЙ КОНФОРМАЦИИ ГЕМА И ГЛОБИНА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

© 2020 г. О.В. Слатинская, О.Г. Лунева, Л.И. Деев, С.Н. Орлов, Г.В. Максимов

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119892, Москва, Ленинские горы, 1/12

E-mail: gmaksimov@mail.ru, slatolya@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 31.01.2020 г.

С помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния в диапазоне 1000–3000 см⁻¹ исследованы изменения конформации гема и глобина гемоглобина эритроцитов человека при различных температурах и содержании кислорода. Показано, что при гипоксии меняется конформация гемоглобина за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов, а также выявлены изменения вклада валентных симметричных и ассиметричных колебаний СН₂- и СН₃-радикалов аминокислот гистидина (2850, 2860, 2900 см⁻¹) и лизина (2880, 2860 см⁻¹). Обсуждаются механизмы связывания кислорода гемоглобином, локализованным в при- мембранной области и цитоплазме клетки.

Ключевые слова: гемоглобин, эритроцит, комбинационное рассеяние, рамановская спектроскопия, гипоксия.

DOI: 10.31857/S0006302920020052

Известно, что одной из причин развития патологии в тканях является гипоксия, которая зависит от ряда факторов – скорости кровотока, диаметра сосудов, взаимодействия эритроцитов с клетками эндотелия, а также свойствами гемоглобина (Гб) [1]. В частности, скорость кровотока зависит от деформируемости эритроцитов и выхода аденозинтрифосфата, стимулирующего пуринергические рецепторы и каскад реакций в эндотелиальных клетках сосудов, сопровождающийся выходом вазорелаксантов [2]. Ключевым звеном регуляции внутриклеточных процессов в самом эритроците является Гб, который в комплексе с цитоплазматическим доменом белка полисы 3 фиксирует О₂ в мембране [3, 4]. Так как гемоглобин является единственным О₂-связывающим белком в эритроцитах, то обратимая ассоциация дезоксигенированного Гб с последующими звеньями внутриклеточной сигнализации может рассматриваться как механизм запуска О₂-зависимых процессов в эритроците [5]. Важно, что при гипоксии было обнаружено изменение содержания других ассоциированных с мембраной цитоплазматических белков. Возмож-

но, эти изменения лежат в основе механизма не только изменения структурной целостности мембраны, выброса аденозинтрифосфата, но и изменения упорядоченности молекул Гб в цитоплазме клетки [6, 7].

Очевидно, что для понимания развития гипоксии на клеточном уровне необходимо исследовать изменения конформации гема и глобина гемоглобина при переносе О₂ в эритроцит. Одним из методов, позволяющих оценить одновременное изменение конформации гема и структуры глобина Гб, является метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), используемый как для исследования деформации метиновых групп порфиринового макроцикла гема, так и для оценки вклада валентных колебаний СН-групп аминокислот гемоглобина и белков плазматической мембраны эритроцита (табл. 1) [8–11].

В работе исследовали изменения конформации гема и его ближайшего белкового окружения в глобине при нормобарической гипоксии и воздействии температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили раствор гемоглобина, суспензия эритроцитов и тени эритро-

Сокращения: Гб — гемоглобин, КР — комбинационное рассеяние.

Таблица 1. Полосы спектра КР гемопорфирина гемоглобина при возбуждении лазером 532 нм и соответствие полос с колебаниями связей порфирина

Частотный сдвиг, см ⁻¹	Тип симметрии колебаний	Причина изменения
1172	ν_{30} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда
1375	ν_4 , A _{1g} , симметричные колебания пиррольных полуколец	Редокс-состояние железа (Fe ²⁺), присутствие лиганда
1548–1552	A _{2g}	Спиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина
1580–1588	ν_{19} , A _{2g} асимметричные колебания метиновых мостиков между пирролами	Низкоспиновое состояние железа (Fe ³⁺), диаметр гемоглобина
2850	A _{1g}	Симметричное растяжение СН
2880	A _{1g}	Асимметричное растяжение СН
2930 (оксигемоглобин)		Симметричное СН ₃ — растяжение, также С–Н-колебания от СН-боковой цепи свободной аминокислотной группы.
2940 (дезоксигемоглобин)	A _{1g}	Зависят от изменения внешнего воздействия или температуры

Примечание. Таблица составлена на основании данных работ [11, 12–16].

цитов, выделенные из крови здоровых доноров ($n = 10$, возраст 20–40 лет). Кровь забирали натощак из локтевой вены в вакуумные пробирки Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия). В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20–50 Ед/мл крови). После забора кровь хранили при температуре 4°C. Осаждение форменных элементов крови проводили центрифугированием при 1500 g в течение 10 мин при температуре 4°C на лабораторной центрифуге Laborfuge 400R (Thermo Scientific, США). Плазму и лейкоциты удаляли, осадок трехкратно отмывали буфером А следующего состава (145мМ NaCl, 5мМ KCl, 1мМ раствора CaCl₂, 4мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1мМ MgSO₄, 5 мМ глюкозы, pH 7.0). Выделенную суспензию эритроцитов ($Ht = 40\%$) хранили при температуре 4°C и использовали в течение трех часов. Для выделения гемоглобина к суспензии эритроцитов добавляли фосфатный буфер (4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, pH 7.4) в десятикратном объеме, после чего суспензию тщательно перемешивали и центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин при температуре 4°C. Супернатант отделяли и хранили при 4°C. Концентрацию гемоглобина в растворе определяли по оптической плотности, измеренной на спектрофотометре Hitachi 557 (Hitachi, Япония) при длине волны 415 нм.

Тени эритроцитов получали трехкратной отмывкой осадка после гемолиза эритроцитов при

12000 g в течение 30 мин при температуре 4°C. Содержание теней оценивали по концентрации мембранных белков методом Лоури [17], оно составило 4.9 ± 0.4 мг/мл.

Вытеснение кислорода из суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина проводили газовой смесью, содержащей азот и 0.04% CO₂ (ООО «ПГС-сервис», Россия). Вытеснение проводили путем продувки газовой смесью через газовую фазу над пробой в течение 20 мин (скорость потока газовой смеси 0.1 л/мин [18] при постоянном перемешивании и комнатной температуре. Используемые в работе параметры вытеснения кислорода позволяют получить пробы суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина в состоянии нормобарической гипоксии, поскольку после вытеснения в пробах присутствовал главным образом дезоксигемоглобин (определяли путем регистрации и анализа спектров КР, методику см. ниже). Контрольные пробы суспензии эритроцитов и раствора гемоглобина (нормоксия) были приготовлены в таких же условиях, но вместо газовой смеси без кислорода использовали воздух. Образцы помещали в стеклянные гематокритные капилляры с диаметром поперечного сечения 1 мм (ООО «Агат-Мед», Россия). Все манипуляции при заполнении капилляров осуществляли в герметичном боксе при постоянной подаче газовой смеси (азот с 0.04% CO₂). Для нормализации избыточного давления гипоксической смеси в

боксе применяли воздушный клапан с порогом срабатывания около 1 атм. Продувку предварительно помещенных в бокс гематокритных капилляров проводили в течение 2 мин. Контроль парциального давления кислорода в газовой смеси внутри бокса осуществляли при помощи электрода KE-25 (Figaro Engineering Inc., Япония). После заполнения капилляры герметично запаивались и хранились при температуре 4°C не более 3 ч.

Исследование конформации гема и глобина гемоглобина проводили методом спектроскопии комбинационного рассеяния. Спектры КР регистрировали с помощью конфокального микроскоп-спектрометра NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в диапазоне 1000–3000 см⁻¹, с шагом измерения 0.8 см⁻¹, регистратор – CCD-детектор с пельтье-охлаждением –50°C (объектив 5× с апертурой 0.15, решетка 600 штр./мм), мощность лазера на образце 3 мВт, длина волны возбуждения 532 нм, время регистрации одного спектра – 15 с, количество накопленных сигналов – 3. Изменение температуры проводили в диапазоне 22–36°C в ячейке прибора, время адаптации образца к температуре – 5 мин. Спектры КР обрабатывали в программе Origin2017 (OriginLab Corp., США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектров. Лазер с длиной волны возбуждающего света 532 нм был выбран для минимизации вклада в спектр КР сигналов от липидов и белков мембраны эритроцитов [11, 16, 17].

Для оценки вклада различных групп молекулы гемоглобина использовали величины соотношений интенсивностей полос спектра КР (табл. 1) [8, 11, 18, 19]:

- I_{1375}/I_{1127} – вклад боковых –CH₃-групп колебаний полуколец пиррола в гемопорфирине, выраженных при изменении конформации глобина в непосредственной близости от гема, характеризует выраженность симметричных и ассиметричных колебаний пиррольных полуколец (изменение величины соотношения характеризует изменение конформации гемоглобина из Т (дезоксигемоглобин) в R (оксигемоглобин));

- I_{1580}/I_{1550} – вклад колебаний метиновых мостиков между пирролами в гемопорфирине, выраженных при деформации макроцикла (характеризует сродство Гб к лигандам, в частности к кислороду);

- I_{2850}/I_{2880} – вклад симметричных колебаний к несимметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот;

- I_{2930}/I_{2850} – вклад колебаний симметричных концевых метиленовых групп к симметричным колебаниям метиленовых групп аминокислот

(характеризует изменение полярности окружения аминокислот).

Для регистрации ζ -потенциала суспензии эритроцитов, который характеризует изменение поверхностного заряда клетки [20], использовали Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Для этого 1 мл суспензии эритроцитов ($Ht = 40\%$) помещали в пластиковую кювету с золотыми электродами для регистрации ζ -потенциала и тщательно перемешивали во избежание образования пузырей воздуха или скопления эритроцитов в одной из частей кюветы. Измерения проводили в термостатируемой ячейке при температуре 25 и 36°C, время адаптации образца к температуре – 60 с, количество снятых измерений – 100. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Malvern, поставляемое в комплекте с прибором, и программу MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что спектры КР гемоглобина в растворе и в суспензии эритроцитов имеют характерные полосы в области 1000–3000 см⁻¹ (рис. 1). В отсутствие гемоглобина в спектре КР теней эритроцитов были выявлены только полосы в области 2800–3100 см⁻¹, обусловленные валентными колебаниями связей СН-групп аминокислот (рис. 1 и 2а, табл. 1) [16, 21]. Вероятно, полосы КР-спектра в области 2800–3100 см⁻¹ обусловлены валентными симметричными и ассиметричными колебаниями СН₂- и СН₃-радикалов аминокислот гистидина (2850, 2860, 2900 см⁻¹) и лизина (2880, 2860 см⁻¹) [16, 22–25].

На наш взгляд, перенос молекулы кислорода из внешней среды в эритроцит осуществляется в несколько этапов: сначала кислород проникает в липидный бислой плазматической мембраны, затем координируется в гемопорфириновом цикле дезоксигемоглобина, фиксированным в белке полосы 3, и, наконец, оксигемоглобин десорбируется с молекулой кислорода в клетку, где осуществляются белок-белковые взаимодействия, меняющие способность гема фиксировать молекулу кислорода. Таким образом, в ходе этого процесса должна сначала меняться конформация гема, а затем конформация глобина.

Для проверки данного предположения контролировали изменения конформации гема при вытеснении кислорода из среды инкубации с выделенным гемоглобином и суспензией эритроцитов, регистрируя КР-спектр в области 1000–1800 см⁻¹. Были выявлены характерные различия в изменениях амплитуды полос 1355 и 1375 см⁻¹ в

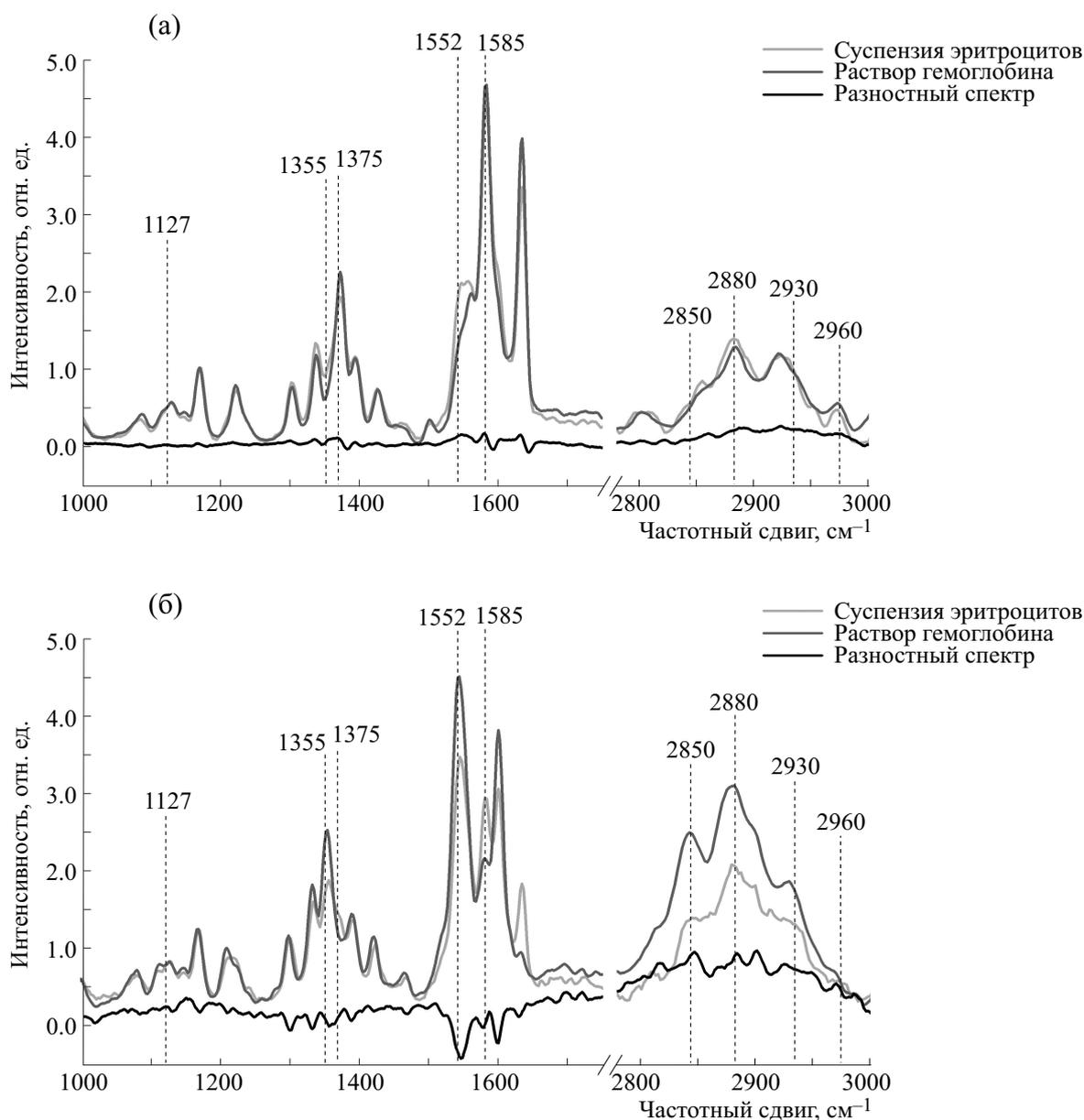


Рис. 1. Спектры КР гема и глобина в состоянии нормоксии (а) и гипоксии (б) суспензии эритроцитов и раствора Гб, область $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$. Спектры нормированы на полосу 1220 см^{-1} (в соответствии с работой [9]).

области $1300\text{--}1400\text{ см}^{-1}$, 1552 и 1580 см^{-1} – в области $1500\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ (рис. 3) [13, 22]. Так, при гипоксии изменения в области $1500\text{--}1650\text{ см}^{-1}$ для выделенного Гб были более выражены, чем у Гб в эритроцитах (на $14.20 \pm 0.52\%$). В то же время в области $1300\text{--}1400\text{ см}^{-1}$ у выделенного Гб интенсивность спектра КР на $16.03 \pm 0.45\%$ выше, чем у Гб в эритроцитах. Важно, что в области $1300\text{--}1450\text{ см}^{-1}$ при гипоксии у Гб в клетке наблюдается сдвиг ряда полос КР-спектра, что характерно для изменения длины сопряжения двойных связей пиррольных колец гемопорфирина гема.

В области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ КР-спектра (область валентных колебаний СН-связей аминокислот глобина) были выявлены изменения вклада полос 2850 и 2880 см^{-1} , более выраженные для выделенного гемоглобина (на $13.20 \pm 0.23\%$), чем для гемоглобина в клетке [12, 21] (рис. 2 и 3; табл. 1). Известно, что при гипоксии изменения в области КР-спектра от 200 до 500 см^{-1} обусловлены связью Fe–His, что также подтверждается нашими данными по изменениям вклада гистидина в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ [25, 27]. Отметим, что при нормоксии и гипоксии полосы 2850 см^{-1} и

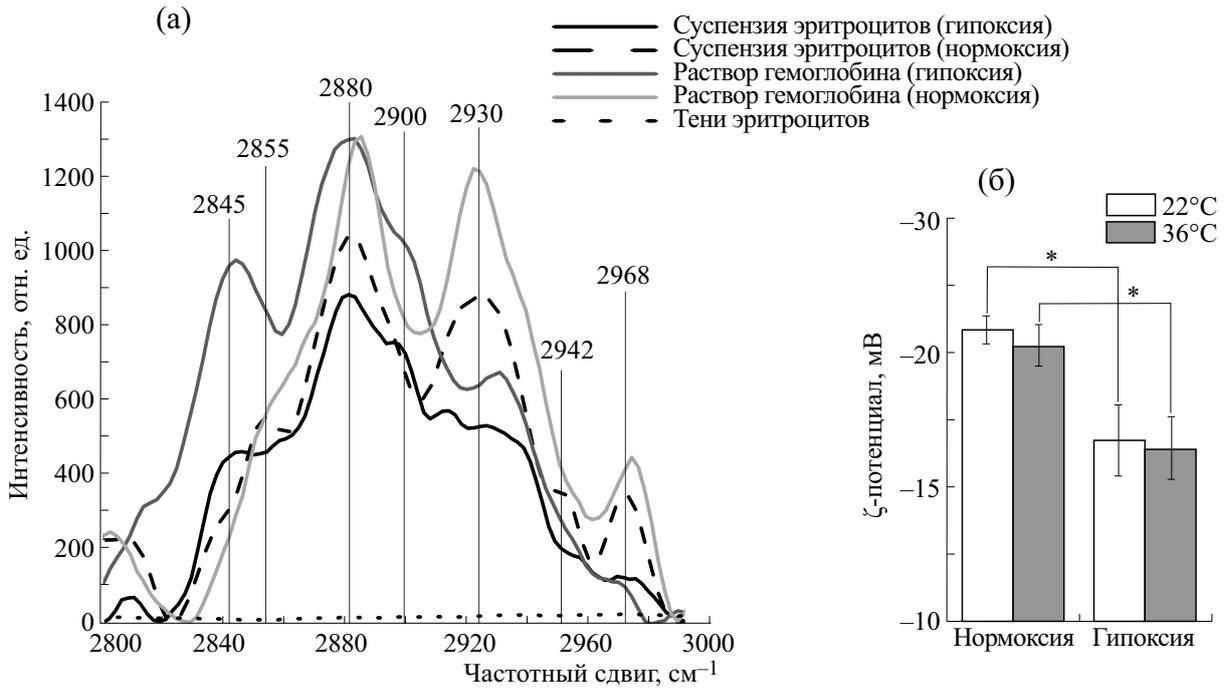


Рис. 2. (а) — Область спектра КР валентных колебаний в суспензии эритроцитов, растворе Гб и тенях эритроцитов в состоянии нормоксии и гипоксии в области $1000\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, спектры не нормированы; (б) — ζ -потенциал мембраны эритроцита в условиях нормоксии и гипоксии (* — $p \leq 0.05$).

2930 см^{-1} выделенного Гб смещены в более высокочастотную область по сравнению с Гб в клетках, что может быть обусловлено изменением конформации глобина за счет увеличения упорядоченности расположения молекул в клетке по сравнению с раствором [21].

В данной работе изменения конформации глобина инициировали за счет увеличения температуры раствора с гемоглобином или суспензией эритроцитов. Известно, что в температурном диапазоне $22\text{--}36^\circ\text{C}$ отсутствуют фазовые переходы липидов в плазматической мембране эритроцита [15, 19]. В связи с этим возможно, что изменения спектра КР суспензии эритроцитов в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ будут связаны исключительно с изменением белков, в первую очередь гемоглобина [18, 27] (табл. 2, рис. 4). При увеличении температуры на фоне нормоксии (рис. 5) выявлены существенные различия в изменении конформации гема и глобина в зависимости от упаковки молекул Гб (суспензия эритроцитов или раствор гемоглобина): вклад пиррольных колец и винильных групп снижается в эритроците, а в глобине существенно увеличивается плотность упаковки белка и снижается полярность окружения. Так, нами показано, что увеличение температуры существенно меняет величину соотношения I_{1375}/I_{1172} КР-спектра Гб в растворе, что соответствует изменению конформации пиррольных

колец гема (снижение на $32.86 \pm 0.45\%$), которые не обнаружены в суспензии эритроцитов.

При гипоксии (снижении доли комплексов оксигемоглобина в пробе) гем меняет свою конформацию за счет вклада пиррольных колец (увеличение I_{1375}/I_{1172} , на $21.07 \pm 0.18\%$) и валентных колебаний групп винилов (увеличение I_{1580}/I_{1550} на $20.26 \pm 0.17\%$) в суспензии эритроцитов и выделенного Гб (на $17.60 \pm 0.68\%$ и $15.08 \pm 0.53\%$ соответственно). Отметим, что изменения в гемовой части Гб более выражены для суспензии эритроцитов, чем для выделенного гемоглобина, что, вероятно, свидетельствует об эффекте большей упорядоченности молекул гемоглобина в клетке, чем в растворе. Также в глобине гемоглобина клетки при гипоксии возрастает вклад полярного окружения аминокислот (увеличение соотношения I_{2930}/I_{2850}), но не меняется плотность упаковки белка (I_{2850}/I_{2880}) [11]. В аналогичных условиях у глобина выделенного Гб меняется как плотность упаковки, так и полярность окружения глобина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовали молекулярный механизм изменения конформации гема и глобина в эритроците, который чувствителен к изменениям парциального давления O_2 и определяет

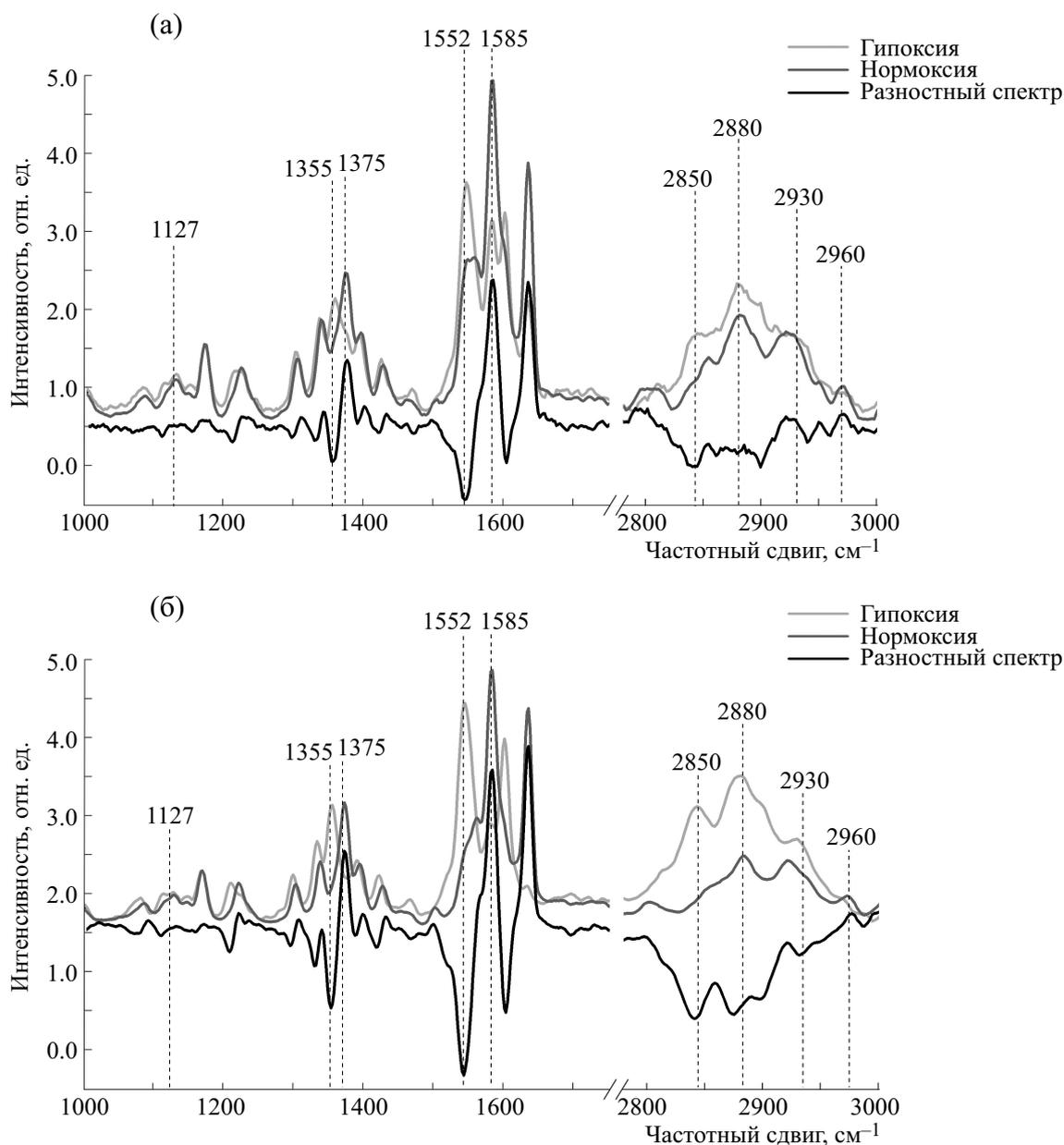


Рис. 3. Спектры КР суспензии эритроцитов (а) и раствора гемоглобина (б) в условиях нормоксии и гипоксии и их разностный спектр. Спектры нормированы на максимум полосы 1220 см^{-1} (в соответствии с работой [9]).

формирование комплекса Гб с белком полосы 3, а также олигомеризацию гемоглобина в цитоплазме. Известно, что Гб связывается с мембранами эритроцитов с большим сродством, чем оксигемоглобин, при этом N-конец белка полосы 3 локализуется в центральной полости тетрамера Гб, которая недоступна при оксигенации Гб. Известно, что NH_2 -терминальный участок белка полосы 3 имеет анионный сегмент и может входить в катионную центральную полость дезоксигемоглобина, которая значительно сужается при связывании O_2 (это снижает сродство O_2 к Гб)

[27]. Важно, что при гипоксии (снижение числа комплексов гема с O_2) меняется конформация гемопорфирина за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов [9, 28]. Нами выявлены изменения вклада расположенных близко к гему аминокислот гистидина и лизина в глобине: смещение полосы 2930 см^{-1} до 2940 см^{-1} , вероятно, за счет изменения конформации глобина и увеличения вклада лизина [21]. Таким образом, состояние гипоксии характеризуется изменением конформации и способности гемопорфирина Гб

Таблица 2. Изменение конформации гема и глобина при различном парциальном давлении O_2

Соотношение	Температура			
	22°C		22–36°C	
	Суспензия эритроцитов	Выделенный Гб	Суспензия эритроцитов	Выделенный Гб
I_{1375}/I_{1127}	Колебания пирролов в отсутствие O_2 менее выражена	Колебания пирролов в отсутствие O_2 менее выражена	При гипоксии вклад пирролов возрастает, при нормоксии не меняется	При гипоксии вклад пирролов снижается, при гипоксии неизменно
I_{1580}/I_{1550}	Колебания винильных групп в отсутствие O_2 менее выражена	Колебания винильных групп в отсутствие O_2 менее выражена	При гипоксии вклад валентных колебаний винильных групп возрастает, при нормоксии не меняется	При гипоксии вклад валентных колебаний винильных групп не меняется, при нормоксии увеличивается
I_{2850}/I_{2880}	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот более выражен, снижается плотность упаковки белка при отсутствии O_2	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот более выражен, снижается плотность упаковки белка при отсутствии O_2	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот при дезоксигемоглобине не меняется, при оксигемоглобине снижается плотность упаковки белка	Вклад валентных колебаний СН-радикалов аминокислот не меняется
I_{2930}/I_{2850}	Снижается в состоянии гипоксии	Снижается в состоянии гипоксии	Полярность окружения при нормоксии снижается, при гипоксии увеличивается	Полярность окружения не меняется

связывать O_2 . При увеличении температуры должны наблюдаться изменения конформации белков клетки, в первую очередь глобина. В клетке (но не в выделенном Гб) при изменении температуры на фоне гипоксии увеличивается вклад колебания винильных групп и пиррольных колец гема. Отметим, что зависимые от температуры изменения конформации глобина при гипоксии, вероятно, возможны за счет полярного окружения аминокислот (I_{2930}/I_{2850}) [11]. Мы связываем это с изменениями структуры белков мембраны и цитоплазмы, так как при этих температурах фазовые переходы в липидах мембраны клетки не выявлены [17]. Вероятно, при связывании кислорода изменения конформации гема и расположения близлежащих к гему аминокислот Гб (например, гистидина и лизина) меняют локализацию анионного сегмента белка полосы 3 вследствие изменения расположения аминокислот или увеличения плотности отрицательного заряда в центральной полости Гб.

Все это происходит в плазматической мембране эритроцита, и изменение конформации гема и глобина при связывании кислорода может отражаться на величине поверхностного заряда мембраны [20]. Действительно, ζ -потенциал в условиях нормоксии составляет -20.8 ± 0.5 мВ и 16.7 ± 1.3 мВ в условиях гипоксии (рис. 26). Таким образом, в условиях гипоксии происходит увеличение поверхностного потенциала мембраны, что может быть обусловлено взаимодействием дезоксигемоглобина с мембраной через белок полосы 3 и возможными структурными изменениями мембраны.

Другим элементом внутриклеточной сигнальной системы эритроцитов является обусловленное гипоксией изменение сродства к мембране не только Гб, но и целого ряда цитоплазматических белков [7, 18]. В зависимости от упорядоченности молекул Гб в цитоплазме по сравнению с выделенным в раствор гемоглобином меняется как конформация гема (за счет валентных колебаний

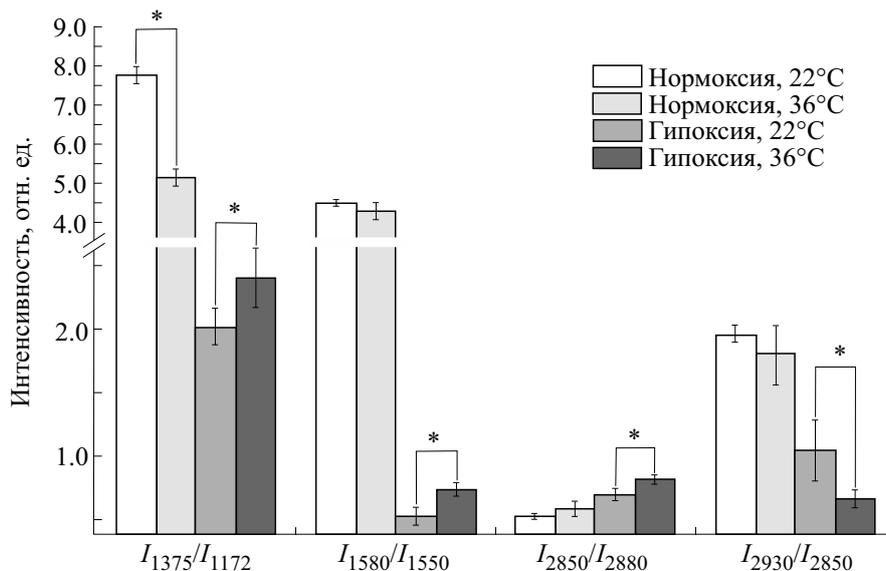


Рис. 4. Соотношения интенсивностей полос спектра КР раствора Гб при нормоксии (* – $p \leq 0.05$).

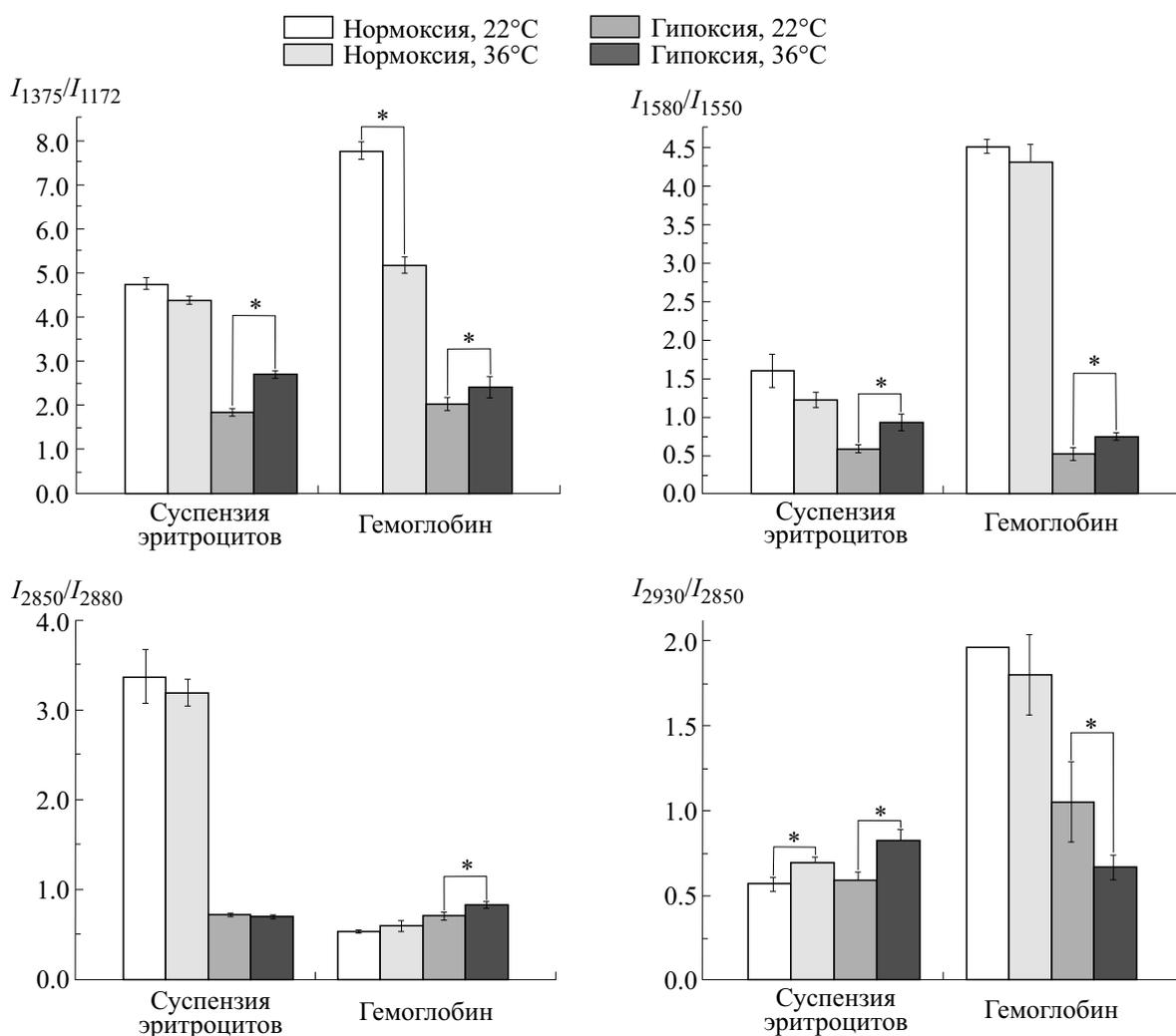


Рис. 5. Соотношения интенсивностей полос спектра КР в области гема (вверху) и глобина (снизу) для суспензии эритроцитов и раствора Гб в условиях нормоксии при температурах 22 и 36°C (* – $p \leq 0.05$). Пояснения в тексте.

пиррольных колец, связей винильных групп), так и глобина (за счет плотности его упаковки).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Holly and B. Glenn, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, 2193 (2007)
2. M. R. Hardeman, P. T. Goedhart, and S. K. Shin, in *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics* (IOS Press Ebooks, 2007), pp. 242–266.
3. J. A. Walder, R. Chatterjee, T. L. Steck, et al., *J. Biol. Chem.* **259** (16), 10238 (1984).
4. R. A. Reithmeier, J. R. Casey, A. C. Kalli, et al. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes* **1858** (7), 1507 (2016)
5. R. R. Tuck, J. D. Schmelzer, and P. A. Low, *Brain* **107** (3), 935 (1984)
6. O.G. Luneva, S. V. Sidorenko, O. O. Ponomarchuk, et al., *Cell. Physiol. Biochem.* **39** (1), 81 (2016)
7. S. V. Sidorenko, O. G. Luneva, T. S. Novozhilova, et al., *Biochemistry, Suppl. Ser. A* **12** (2), 114 (2018)
8. N. A. Brazhe, S. Abdali, A. R. Brazhe, et al., *Biophys. J.* **97** (12), 3206 (2009)
9. B. R. Wood and D. McNaughton, *Biopolymers* **67** (4–5), 1691 (2002)
10. G. V. Maksimov, N. V. Maksimova, A. A. Churin, et al., *Biochemistry (Moscow)* **66** (3), 295 (2001)
11. S. C. Goheen, L. J. Lis, O. Kucuk, et al., *J. Raman Spectroscopy* **24** (9), 275 (1993)
12. N. Parthasarathi, C. Hansen, S. Yamaguchi, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **109** (13), 3865 (1987)
13. B. R. Wood, P. Caspers, G. J. Puppels, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (5), 1691 (2007)
14. S. Nagatomo, M. Nagai, Y. Mizutani, et al., *Biophys. J.* **89** (2), 1203 (2005)
15. S. Choi, T. G. Spiro, K. C. Langry, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **104** (16), 4345 (1982)
16. N. K. Howell, G. Arteaga, S. Nakai, et al., *J. Agricult. Food Chem.* **47** (3), 924 (1999)
17. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
18. S. V. Sidorenko, R. H. Ziganshin, O. G. Luneva, et al., *J. Proteomics* **184**, 25 (2018)
19. I. P. Torres Filho, J. Terner, R. N. Pittman, et al., *J. Appl. Physiol.* **104** (6), 1809 (2008)
20. I. A. Tikhomirova, A. V. Murav'ev, L. A. Mikhailichenko, et al., *Human Physiol.* **32**(6), 748 (2006)
21. K. M. Marzec, D. Perez-Guaita, M. De Veij, et al., *ChemPhysChem* **15** (18), 3963 (2014)
22. B. R. Wood, L. Hammer, and D. McNaughton, *Vibrational Spectroscopy* **38** (1-2), 78 (2005)
23. J. Surmacki, R. Musial, R. Kordek, et al., *Mol. Cancer* **12** (1), 48 (2013)
24. M. Nagai, N. Mizusawa, T. Kitagawa, et al., *Biophys. Rev.* **10** (2), 271 (2018)
25. J. M. Friedman, T. W. Scott, R. A. Stepanoski, et al., *J. Biol. Chem.* **258** (17), 10564 (1983)
26. S. Nagatomo, M. Nagai, and T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (26), 10101 (2011)
27. С. Н. Орлов, *Бюл. сибирской медицины* **18** (2), 234 (2019)
28. A. A. Semenova, A. P. Semenov, E. A. Gudilina, et al., *Mendelev Communications* **26** (3), 177 (2016)

Study of Conformational Changes in Heme and Globin in Temperature Variation and Normobarical Hypoxia

O.V. Slatinskaya, O.G. Luneva, L.I. Deev, S.N. Orlov, and G.V. Maksimov

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119892 Russia

Combined dynamic light scattering and Raman spectroscopy approach in the 1000–3000 cm⁻¹ spectral range was applied in the study of conformational and structure changes in the heme group and globin of the hemoglobin protein in human red blood cells at various temperatures and oxygen content. It is shown that in hypoxia, the conformation of hemoglobin changes as the contribution of the pyrrole rings of hematoporphyrin and vibrational motions of the molecules in the vinyl groups increase. Also, we revealed modification in the contribution of symmetric and asymmetric vibrations of the CH₂/CH₃ radicals of histidine (2850, 2860, 2900 cm⁻¹) and lysine (2880, 2860 cm⁻¹) amino acids. Mechanisms of binding of oxygen by hemoglobin, localized in the submembrane region and cytoplasm of cells are discussed.

Keywords: hemoglobin, red blood cells, combined dynamic light scattering, Raman spectroscopy, hypoxia

УДК 577.3

АНАЛИЗ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

© 2020 г. Г.С. Онхонова, П.Ю. Торжкова, В.Ю. Марченко, С.В. Святченко, А.С. Гудымо, А.Б. Рыжиков

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово Новосибирской обл.

E-mail: onhonova_gs@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 28.01.2020 г.

Изучена рецепторная специфичность для штаммов вируса гриппа птиц A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) и A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2). С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса для выбранных штаммов получены значения равновесных констант диссоциации с аналогами рецепторов типа $\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6. Обнаружено, что для штаммов A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) и A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) определяется связь с человеческим типом рецепторов ($\alpha 2$ -6) в отличие от штамма A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2), который специфичен только к птичьему типу рецепторов ($\alpha 2$ -3).

Ключевые слова: вирус гриппа, рецепторная специфичность, равновесная константа диссоциации, поверхностный плазмонный резонанс.

DOI: 10.31857/S0006302920020064

Мониторинг вируса гриппа является частью глобальной системы надзора и имеет важную научно-практическую значимость с точки зрения предупреждения и контроля ежегодных эпидемий, а также повышения готовности к пандемиям. Вирусологические и серологические методы исследования позволяют подтверждать клинические диагнозы, дифференцировать грипп от острых респираторных вирусных инфекций другой этиологии, изучать эволюцию штаммов, а также отслеживать уровень коллективного иммунитета. Оценка рецепторной специфичности на сегодняшний день не входит в перечень обязательных исследований, хотя ее практическая значимость очень высока. Одним из определяющих этапов в процессе жизненного цикла вируса гриппа является рецепторное связывание оболочечного вирусного белка гемагглютинина с сиаловыми кислотами на поверхности клеток-мишеней [1]. Это взаимодействие определяет весь дальнейший ход событий: проникновение в клетку, репликацию, почкование и последующую передачу вируса. Возможность вирусного белка гемагглютинина связываться с рецепторами клеток организма является одним из факторов, определяющим видо-

вую специфичность хозяина по отношению к вирусной инфекции.

Для оценки специфичности связывания вирусного белка гемагглютинина с рецепторами существуют различные стационарные и кинетические методы: иммуноферментный анализ, гликановый скрининг, интерферометрия биослоя, микроскопический термофорез и др. Метод поверхностного плазмонного резонанса также применяется для исследования рецепторной специфичности, но в исследованиях в основном используют гемагглютинин вируса гриппа, полученный генно-инженерным способом. Целью данной работы было получение и изучение специфичности цельновирионных образцов, что является достаточно сложной задачей для исследователя.

ТЕОРИЯ

Основными белками на поверхности вирионов гриппа являются гемагглютинин и нейраминидаза. Гемагглютинин отвечает за связь с сиаловой кислотой, а также участвует в процессе слияния вирусной и клеточной мембран. Нейра-

минидаза имеет противоположную активность, отщепляя сиаловую кислоту с поверхности мембраны, тем самым не дает заражать уже инфицированную клетку.

Строение человеческих рецепторов отличается от птичьих и для оптимального взаимодействия с клеткой-мишенью необходимо наличие соответствующих белков на поверхности вириона. Гемагглютинин птичьих штаммов распознает сиаловые кислоты, связанные с предпоследней галактозой через связь $\alpha 2-3$, а человеческие штаммы преимущественно связываются с $\alpha 2-6$ сиалозидами [2, 3]. Изменения в рецепторсвязывающих свойствах белков достигаются мутациями в рецепторном сайте связывания. В некоторых случаях подобные мутации приводят к тому, что штамм становится способен пересекать видовой барьер и адаптироваться к другим видам, включая людей. Такие случаи особо важны для мониторинга по причине высокой вероятности возникновения вспышек заболевания.

Принцип поверхностного плазмонного резонанса основан на явлении полного внутреннего отражения, возникающего на границе раздела стеклянной призмы и нанесенной на нее золотой пленки. На поверхности пленки генерируется затухающая волна, которая возбуждает свободные колеблющиеся электроны. При определенном угле падения возникает резонанс, что приводит к снижению интенсивности отраженного света. Резонансный угол является функцией показателя преломления на границе раздела металлической пленки и раствора. Таким образом, сдвиг угла резонанса отражает события на границе раздела, такие как адсорбция белка на поверхности и взаимодействие антиген-антитело. Так как взаимодействие вириона с клеткой-мишенью хорошо описывается кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия [4], метод поверхностного плазмонного резонанса может быть использован для исследования специфичности связывания штаммов вируса гриппа.

ЭКСПЕРИМЕНТ

Оценку рецепторной специфичности проводили с помощью системы ProteOn XPR36 (BioRad, США). Выбранные штаммы вируса гриппа были наработаны на развивающихся куриных эмбрионах [5]. Далее аллантоисную жидкость, содержащую вирионы, инактивировали и очищали с помощью комбинации методов фильтрования и хроматографии [6]. Чистота полученных образцов была проверена в ходе электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Общую кон-

центрацию белка в конечном продукте измеряли методом Бредфорда. В качестве аналогов рецепторов $\alpha 2-3$ и $\alpha 2-6$ использовали сиалозиды 3'-Sialyl-N-acetylactosamine (3'SLN) и 6'-Sialyl-N-acetylactosamin (6'SLN) производства Lectinity (Москва), меченные биотином. Для работы использовали чип NLC, покрытый нейтравидином, характеризующимся высокой специфичностью и эффективностью взаимодействия с биотином, которым мечены аналоги рецепторов. Сорбция аналога рецепторов на поверхность чипа проводилась при следующих условиях: раствор сиалозида в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 10–200 мкг/мл подавался со скоростью потока 25–30 мкл/мин и временем контакта от двух до шести минут. После достижения необходимого уровня сорбции подавался исследуемый образец: вирус в фосфатно-солевом буфере с концентрациями от 2 до 30 мкг/мл со скоростью потока 80–100 мкл/мин и временем контакта от пяти до шести минут до выхода на насыщение. Далее начинали диссоциацию путем подачи рабочего буфера в течение 10–15 мин. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения ProteOn Manager 3.1.0.

Также было проведено дополнительное исследование выбранных штаммов на основе иммуноферментного анализа с использованием кинетического метода по принципу, описанному ранее [4]. В качестве аналогов рецепторов использовали сиалозиды 3'-Sialyl-N-acetylactosamine (3'SLN) и 6'-Sialyl-N-acetylactosamin (6'SLN) производства Dextra (Великобритания), меченные биотином.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе работы на развивающихся куриных эмбрионах были наработаны три образца птичьих штаммов вируса гриппа типа А: A/rook/Chanu/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) и A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2). Для выбранных штаммов были получены равновесные константы диссоциации с двумя типами рецепторов – $\alpha 2-3$ и $\alpha 2-6$. Данные представлены в таблице. Для штаммов H5N1 и H5N6 значения, измеренные двумя методами, совпали по порядку. Для штамма H9N2 в случае с рецепторами $\alpha 2-3$ значения также совпали, в то время как значения для связи с рецепторами $\alpha 2-6$ сильно разнятся. Значения, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса, указывают на очень слабое взаимодействие со штаммом H9N2 либо же на полное отсутствие такового. Результат иммуноферментного анализа, напротив, показал наличие связи. Подобная ситуация может быть объяснена возможным неспецифическим взаимодействием,

Равновесные константы диссоциации для выбранных штаммов вируса гриппа А с аналогами рецепторов $\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6, полученные методами поверхностного плазмонного резонанса и иммуноферментного анализа

Штамм	Поверхностный плазмонный резонанс		Имуноферментный анализ	
	3'SLN (Lectinity)	6'SLN (Lectinity)	3'SLN (Dextra)	6'SLN (Dextra)
A/rook/Chany/32/2015 (H5N1)	0.20 ± 0.02	6.3 ± 0.2	0.30 ± 0.02	1.7 ± 0.7
A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6)	0.01 ± 0.001	0.040 ± 0.003	0.04 ± 0.02	0.050 ± 0.005
A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2)	0.30 ± 0.02	>300	1.6 ± 1.1	17.5 ± 9.6

Примечание. Значения констант диссоциации выражены в мкМ.

свойственным иммуноферментному анализу, или же результатом применения реагентов разных производителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были исследованы следующие штаммы вируса гриппа птиц: A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) и A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2). С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса получены равновесные константы диссоциации с клеточными рецепторами так называемого «птичьего» типа (3'-Sialyl-N-acetylactosamine) и «человеческого» типа (6'-Sialyl-N-acetylactosamine). Для сравнения было проведено дополнительное исследование на основе иммуноферментного анализа. Полученные результаты показали, что несмотря на доминирующую специфичность к рецепторам типа $\alpha 2$ -3, штаммы A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) и A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) специфичны и к рецепторам типа $\alpha 2$ -6, что указывает на их потенциальную угрозу для человека. Штамм A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) специфичен только к рецепторам типа $\alpha 2$ -3 по результатам измерения на ProteOn XPR36 и по этой причине не относится к потенциально опасным штаммам вируса гриппа в отношении человека, хотя иммуноферментный анализ определил связь с «человеческим» типом рецепторов. Для уточнения результатов необходимо дальнейшее изучение.

Полученные данные могут быть использованы для анализа общей картины специфичности вируса гриппа птиц по отношению к рецепторам клеток верхнего дыхательного тракта человека и принятия соответствующих мер защиты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 13/19 «Разработка генетических и фенотипических маркеров для количественной оценки пандемического потенциала зоонозных вирусов гриппа».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. Ильичева, С. В. Нетесов и В. Н. Гуреев, *Вирусы гриппа: методическое пособие* (Новосибирский гос. ун-т, Новосибирск, 2014), ч. 1.
2. A. S. Gambaryan, S. S. Iamnikova, D. K. L'vov, et al., *Mol. Biol.* **36**, 542 (2002).
3. K. Shinya, M. Ebina, S. Yamada, et al., *Nature* **440**, 435 (2006).
4. Г. С. Онхонова, С. В. Мальцев и А. Б. Рыжиков, *Биофизика* **64** (4), 661 (2019).
5. Т. Баррет, П. Берд, Дж. Клегг и др., *Вирусология: методы* (Мир, М., 1988).
6. Р. Скоупс, *Методы очистки белков* (Мир, М., 1985).

Analysis of Receptor Specificity of Influenza A Virus Strains by Surface Plasmon Resonance

**G.S. Onkhonova, P.Yu. Torzhkova, V.Yu. Marchenko, S.V. Svyatchenko,
A.S. Gudymo, and A.B. Ryzhikov**

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

The receptor specificity for strains of avian influenza virus A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) and A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) was studied. The surface plasmon resonance was used to assess the ability of selected strains to bind to α 2-3 and α 2-6 receptor analogs and the values of the equilibrium dissociation constants were obtained. It has been found that strains A/rook/Chany/32/2015 (H5N1) and A/common gull/Saratov/1676/2018 (H5N6) display affinity to the human-like receptors (α 2-6) while strain A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) has a specific affinity only for the avian-like receptors (α 2-3).

Keywords: influenza virus, receptor specificity, equilibrium dissociation constant, surface plasmon resonance

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦВЕТЕНИЯ В СОРТЕ НУТА CDC FRONTIER МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

© 2020 г. Б.С. Подольный*, В.В. Гурский**, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

**Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, 194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 26
E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 16.12.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Представлены результаты анализа динамики экспрессии генов, контролирующих переход к цветению у сорта нута CDC Frontier. Построено несколько версий модели, предсказывающей динамику экспрессии пяти генов цветения по данным экспрессии их регуляторов. Модели обучены с помощью метода случайных лесов на опубликованных ранее данных экспрессии десяти генов цветения для условий короткого и длинного дня выращивания растений. Полученные модели правильно предсказывают динамику средних уровней экспрессии в условиях длинного дня. Показано, что модели для CDC Frontier в целом воспроизводят регуляторные взаимодействия между ключевыми генами, описанные для модельного растения *Arabidopsis thaliana*. На основе анализа моделей высказано предположение о том, что данные короткого дня и данные длинного дня содержат качественно разную информацию, что может определяться функционированием разных регуляторных модулей в разных условиях. Среди регуляторов генов идентичности цветковых меристем *API* и *LFY* модели предсказывают лидирующую роль гена *FTa3* как активатора и гена *TFL1c* как репрессора в условиях длинного дня.

Ключевые слова: нут, CDC Frontier, генная сеть цветения, алгоритм случайного леса.

DOI: 10.31857/S0006302920020076

Исследование процессов, лежащих в основе принятия растением решения о переходе к цветению, и, в частности, контроль времени инициации цветения сельскохозяйственных культур имеет важное значение для разработки сценариев эффективной адаптации культур к вариабельности сезонов выращивания [1–3]. Эта задача особенно актуальна в условиях меняющегося климата [4, 5]. В число важных сельскохозяйственных культур входит нут (*Cicer arietinum*), представитель семейства бобовых. К настоящему времени собрано большое количество информации о сходствах и отличиях в механизмах зацветания у бобовых и у модельного организма *Arabidopsis thaliana* [6–12]. Основные гены, контролирующие время перехода к цветению и наиболее полно описанные в *Arabidopsis*, консервативны и присутствуют во многих растениях [6, 13]. Одним из существенных отличий бобовых от *Arabidopsis* является более сложная (составная) архитектура

соцветия, включающая в себя вторичные меристемы соцветия, что подразумевает наличие дополнительных генов, контролирующих идентичность этих меристем [7, 8]. Другим отличием является то, что геномы представителей семейства бобовых содержат несколько гомологов ключевых генов из *Arabidopsis*. В частности, активатор цветения *FLOWERING LOCUS T (FT)* и репрессор цветения *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* присутствуют в нуте в виде соответственно пяти и двух гомологов (гены *FTa1*, *FTa2*, *FTa3*, *FTb*, *FTc* и гены *TFL1a*, *TFL1c*) [14].

Согласно классической схеме регуляции перехода к цветению в модельном растении *Arabidopsis thaliana*, продукты экспрессии *FT*-генов в листьях доставляются в апикальные меристемы растения, где они активируют экспрессию генов идентичности цветковых меристем *LEAFY (LFY)* и *APETALA1 (API)* [15]. Экспрессия этих генов подавляется белками *TFL1*-генов с целью поддержания локального вегетативного состояния. Белки *FT* и *TFL1* осуществляют свою регуляторную функцию, образуя комплекс с транскрипционным фактором *FD* или его гомологом в случае бо-

Сокращения: LD – длинный световой день, SD – короткий световой день, НСКО – нормализованная среднеквадратичная ошибка.

бовых [15, 16]. Высокий уровень *API* можно считать маркером инициации цветения. Были разработаны несколько динамических моделей этой генной сети в *Arabidopsis*, предсказывающих время инициации цветения по уровням экспрессии ключевых генов [15, 17].

Экспрессия десяти генов (пять *FT*-генов, два *TFL1*-гена, а также гены *FD*, *LFY*, *API*), вовлеченных в процесс зацветания, была измерена в двух сортах нута (*ICCV 96029* и *CDC Frontier*) в процессе выращивания растений в условиях короткого и длинного дня [14]. *ICCV 96029* является слабо чувствительным к фотопериоду и самым раннецветущим сортом нута. *CDC Frontier* представляет собой чувствительный к фотопериоду сорт, для которого был построен референсный геном [18]. На полученных данных по экспрессии генов цветения в этих сортах была построена динамическая модель на основе дифференциальных уравнений, которая в случае сорта *ICCV 96029* корректно воспроизводила динамику экспрессии всех генов и позволила протестировать несколько гипотез о функционировании гомологов *FT* и *TFL1* в этом сорте [19]. Однако эта модель не смогла воспроизвести динамику экспрессии в сорте *CDC Frontier*, из-за чего оставалось неясным, является ли эта неудача в моделировании следствием специфики модельного подхода или же связана с особенностями данных для этого сорта нута.

В представленной работе используется другой подход к моделированию динамики экспрессии генов цветения в *CDC Frontier*, основанный на машинном обучении. Используя результаты обучения методом случайного леса, предложен способ построения динамических предсказаний уровней экспрессии в каждый день на основе данных или предсказаний модели в предыдущий день. Полученная таким способом динамика экспрессии в модели исследуется при разных условиях обучения модели, а также при выключении отдельных генов.

ДАнные И МОДЕль ЭКСПРЕССИИ

Модель обучалась на опубликованных ранее динамических данных экспрессии генов цветения в сорте нута *CDC Frontier* [14] (данные в виде csv-файлов можно найти по адресу: <http://doi.org/10.5281/zenodo.1451748>). Рассмотренные гены цветения включают в себя пять гомологов гена *FT* (*FTa1*, *FTa2*, *FTa3*, *FTb*, *FTc*), два гомолога гена *TFL1* (*TFL1a*, *TFL1c*), ген *FD*, а также гены идентичности цветковых меристем *LFY* и *API*. Данные представляют собой средние значения и стандартные отклонения уровней экспрессии, измеренных с 9-х по 43-и сутки после посева с двух- или трехдневным интервалом в условиях длинного (*LD*) или короткого (*SD*) светового дня.

Появление развивающихся цветковых бутонов впервые было детектировано на 31-е сутки развития в условиях короткого дня и на 32-е сутки в условиях длинного дня [14].

Поскольку переход к цветению должен быть связан с ростом экспрессии *API*, несколько поздних наблюдений, соответствующих резкому падению уровня экспрессии *API*, были исключены. Данное падение может быть связано с изменением механизмов регуляции после начала цветения. Таким образом, для дальнейшего анализа из данных длинного дня был исключен один последний день наблюдений, а из данных короткого дня — три последних дня.

Общая схема моделирования описана на рис. 1. Далее детально описаны этапы моделирования, проиллюстрированные на рисунке.

Для построения модели методами машинного обучения необходимы обучающая и тестовые выборки данных. Для этого на первом этапе исходные данные экспрессии мультиплицировались и создавались искусственные выборки значений уровней экспрессии всех генов для каждого дня развития растения. Такие выборки генерировались множественным сэмплением из усеченных нормальных распределений, определенных на положительной вещественной полуоси, где исходные средние значения и стандартные отклонения уровней экспрессии генов были использованы в качестве параметров распределений.

Были рассмотрены два типа моделей: модели первого типа обучались совместно по *LD*- и *SD*-данным, модели второго типа — только по *LD*-данным. Для моделей первого типа в каждый день всего было сгенерировано по 325 значений уровней экспрессии для *LD*- и *SD*-условий с целью обучения и по 125 значений для тестирования. Для обучения и тестирования моделей второго типа было сгенерировано соответственно по 750 и 250 значений.

В исходных данных измерения для *LD* и *SD* не всегда проводили в одинаковые дни, при этом для построения моделей, учитывающих оба типа условий, необходимо, чтобы обучающие и тестовые выборки в каждый день содержали значения для обоих условий выращивания. Для заполнения пропущенных значений была проведена линейная интерполяция *LD*-значений на те дни, когда измерения проводили только для *SD*, и наоборот. Для интерполяции из выборки искусственных данных случайным образом выбирали пары измерений из соседних дней.

Уровни экспрессии *FT*-генов в данных соответствуют экспрессии этих генов в листьях, тогда как уровни экспрессии остальных генов, включая потенциальные гены-мишени *FT*-генов (*API* и *LFY*), соответствуют экспрессии в апикальной

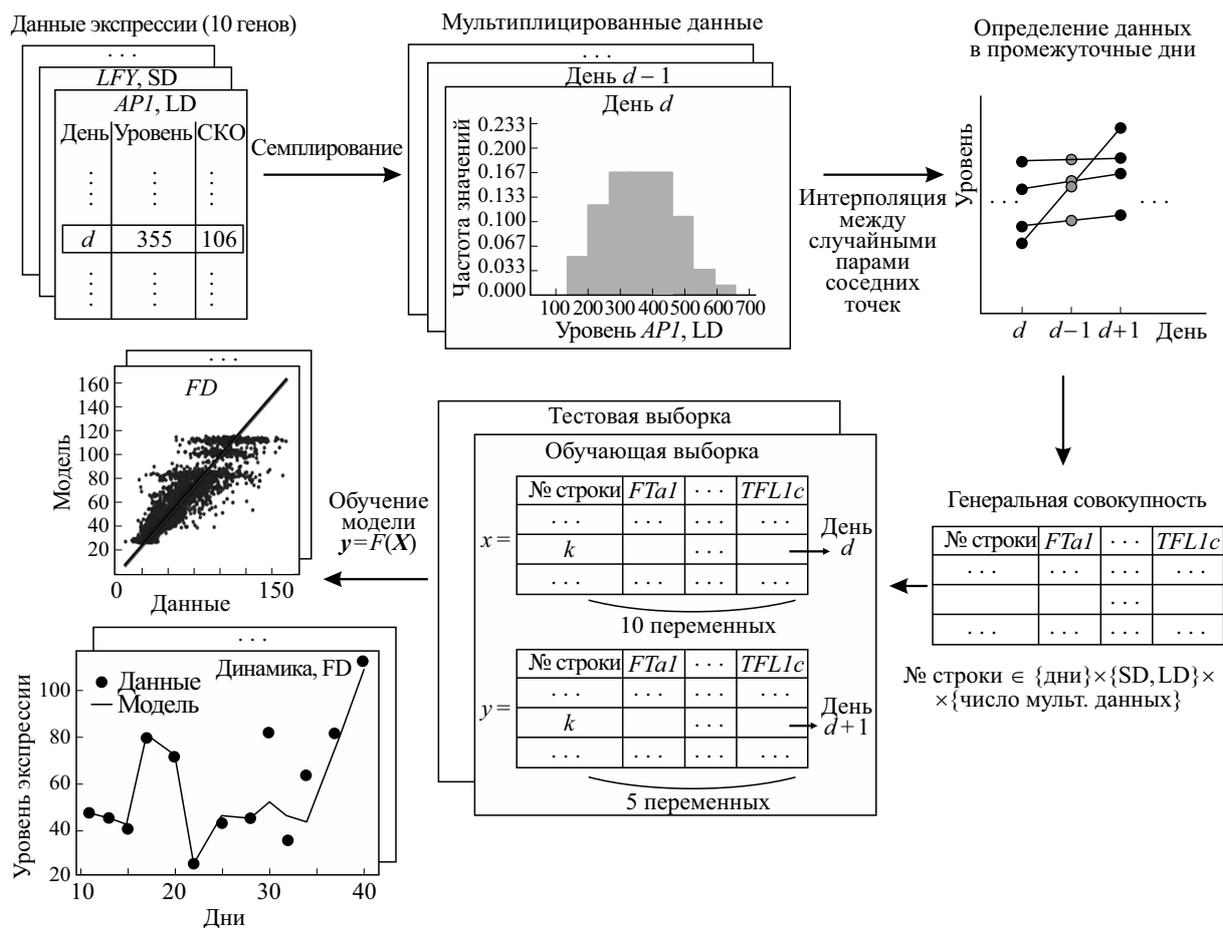


Рис. 1. Схема моделирования. Детальное описание отдельных этапов приведено в тексте.

меристеме. Поскольку модель описывает регуляцию в апикальной меристеме, значения экспрессии *FT*-генов сдвигались с помощью линейной интерполяции на фиксированное время τ , необходимое для транспорта белков FT из листьев в апекс. Исходя из полученной ранее оценки этого времени для *Arabidopsis*, было принято значение $\tau = 0.5$ суток [17]. Для сдвига первого дня измерений (9-е сутки после посева) был добавлен нулевой день с нулевыми значениями уровней экспрессии для всех генов и проведена интерполяция между нулевым и первым днем наблюдений.

В результате такой обработки данных была собрана генеральная совокупность данных, содержащая уровни экспрессии десяти генов (в мультиплицированной форме) для каждого дня и для двух условий выращивания. Из этой совокупности случайным образом делали выборки для обучения и тестирования модели (рис. 1). Модель строилась как регрессионная модель, предсказывающая уровни экспрессии пяти целевых генов (т. е. генов, экспрессирующихся в апикальной меристеме) в текущий день по значениям уровней экспрессии всех десяти генов (т. е. дополнитель-

но с учетом *FT*-генов, экспрессирующихся в листьях) в предыдущий день: $y = F(X)$, где X – вектор, содержащий уровни экспрессии генов *FTa1*, *FTa2*, *FTa3*, *FTb*, *FTc*, *API*, *LFY*, *FD*, *TFL1a*, *TFL1c* в день d ; y – вектор, содержащий уровни экспрессии генов *API*, *LFY*, *FD*, *TFL1a*, *TFL1c* в день $d + 1$. Таким образом, обучающая и тестовая выборки представляли собой наборы факторов – десятимерных векторов уровней экспрессии генов в определенный день и откликов – пятимерных векторов уровней экспрессии целевых генов на следующий день.

АЛГОРИТМ И ПАРАМЕТРЫ ОБУЧЕНИЯ МОДЕЛИ

Для построения и обучения модели использовалась реализация алгоритма случайного леса «*Random Forest Regressor*» из пакета *sklearn* [20]. Для нахождения оптимальной модели производилась настройка следующих гиперпараметров по соответствующим наборам значений:

- количество деревьев: {20, 50, 100, 300},

Таблица 1. Взаимодействия, учтенные в усеченных моделях, согласно генной сети зацветания у *Arabidopsis* [15]

Регуляторы	<i>FT</i> -гены	<i>API</i>	<i>LFY</i>	<i>TFL1</i> -гены	<i>FD</i>
Мишени	<i>API, LFY</i>	<i>LFY, TFL1</i> -гены	<i>API, FD</i>	<i>API, LFY</i>	<i>API, LFY</i>

– минимальное число значений в листе дерева: {10, 20, 50, 100},

– максимальная глубина дерева: {5, 8, 20, без ограничений}.

Для каждого фиксированного значения каждого гиперпараметра проводилось обучение модели на обучающей выборке данных с пятикратной кроссвалидацией, в ходе которого минимизировалось среднеквадратичное отклонение (СКО) вектора откликов y в модели от данных. В результате перебора всех значений гиперпараметров выбиралась модель, дающая минимальное СКО на валидационных выборках.

Были построены два типа моделей вида $y = F(X)$. В моделях первого типа (далее — «полные» модели) не делалось никаких предположений о характере регуляции между генами, являющимися входными факторами в модели и входящими в вектор X , и целевыми генами, входящими в вектор откликов y модели. Математически это выражается в том, что отображение F априори (т. е. до обучения) включает в себя влияние каждого компонента вектора X на каждый компонент вектора y . При построении моделей второго типа (далее — «усеченные» модели) использовалось предположение о том, что исследуемая генная сеть подобна соответствующей генной сети у *Arabidopsis thaliana* [15, 19]. В усеченных моделях отображение F связывает только те пары фактор-отклик из

векторов X и y , которые соответствуют взаимодействиям из генной сети у *Arabidopsis* (табл. 1), при этом характер взаимодействия (активация или репрессия) априори не постулируется и определяется в результате обучения модели.

Полная и усеченная модели обучались на данных двух типов — либо на полной выборке данных, включающей в себя данные по экспрессии для двух условий (LD+SD), либо на данных только для длинного дня (LD). Таким образом, всего было построено и обучено четыре модели: полная модель на данных LD+SD, полная модель на данных LD, усеченная модель на данных LD+SD и усеченная модель на данных LD. В табл. 2 приведены значения гиперпараметров, найденные в ходе обучения каждой из моделей.

СПОСОБЫ ВЫЧИСЛЕНИЯ ДИНАМИЧЕСКИХ ПРЕДСКАЗАНИЙ МОДЕЛИ

После обучения модели F на выборке, содержащей данные сразу для всех дней выращивания, необходимо создать процедуру генерации предсказаний модели в динамике. Были рассмотрены два способа генерации динамики экспрессии целевых генов в модели. В первом способе предсказание $y(d)$ для экспрессии пяти целевых генов в любой день d вычисляли по данным экс-

Таблица 2. Значения гиперпараметров, соответствующие лучшим результатам обучения рассмотренных моделей

Модель		Количество деревьев	Минимальное число значений в листе	Максимальная глубина дерева
Полная LD+SD		100	10	Без ограничений
Полная LD		300	10	Без ограничений
Усеченная LD + SD	<i>API</i>	300	10	Без ограничений
	<i>FD</i>	100	100	5
	<i>LFY</i>	300	10	Без ограничений
	<i>TFL1a</i>	100	100	5
	<i>TFL1c</i>	100	100	5
Усеченная LD	<i>API</i>	300	10	Без ограничений
	<i>FD</i>	300	100	5
	<i>LFY</i>	300	10	Без ограничений
	<i>TFL1a</i>	300	100	5
	<i>TFL1c</i>	100	100	5

Таблица 3. Результаты обучения и тестирования полной модели на выборке LD + SD

	НСКО		Коэффициент корреляции	
	Обучающая выборка	Тестовая выборка	Обучающая выборка	Тестовая выборка
<i>API</i>	0.038	0.062	0.97	0.92
<i>FD</i>	0.062	0.074	0.92	0.89
<i>LFY</i>	0.058	0.084	0.89	0.76
<i>TFL1a</i>	0.051	0.062	0.94	0.91
<i>TFL1c</i>	0.064	0.073	0.91	0.88

Примечание. Для каждого гена отдельно приведены оценки качества предсказаний модели на обучающей и тестовой выборках, в терминах нормализованной среднеквадратичной ошибки (НСКО) и коэффициента корреляции Пирсона. НСКО вычисляли нормализацией СКО на максимальный уровень экспрессии соответствующего гена.

прессии $X(d-1)$ всех десяти генов в предыдущий день $d-1$: $y(d) = F(X(d-1))$, $d = 2, 3, \dots$. Во втором способе динамика предсказаний $y(d)$ строилась согласно следующему алгоритму:

1. По исходным данным $X(1)$ первого дня ($d = 1$) вычисляли предсказания экспрессии пяти целевых генов для второго дня ($d = 2$): $y(2) = F(X(1))$.

2. Во второй день ($d = 2$) строился вектор $X_y(2)$, равный вектору $X(2)$ данных экспрессии для этого дня, в котором уровни экспрессии пяти целевых генов заменялись на соответствующие уровни экспрессии из предсказания $y(2)$ из предыдущего пункта. Таким образом, в векторе $X_y(d)$ из данных берутся только уровни экспрессии пяти *FT*-генов.

3. Предсказания для третьего дня ($d = 3$) вычисляли по вектору $X_y(2)$ из предыдущего пункта. Таким образом, для любого дня, начиная с третьего, динамику экспрессии пяти целевых генов вычисляли по формуле: $y(d) = F(X_y(d-1))$, $d \geq 3$.

Описанные два способа вычисления динамических предсказаний модели можно сравнить с решением модели на основе дифференциальных уравнений. Первый из описанных способов генерации динамических предсказаний модели аналогичен использованному ранее подходу к моделированию динамики экспрессии генов цветения в сорте нута ICCV 96029 [19]. В этом подходе динамические предсказания модели получались путем решения дифференциальных уравнений модели, в правой части которых вместо динамических переменных (уровней экспрессии) подставлялись экспериментальные данные. Такие решения должны рассматриваться лишь как аппроксимация истинного решения модельных уравнений. Второй способ генерации динамики в модели, описанный выше, соответствует такому истинному решению модели, сформулированной в терминах дифференциальных уравнений.

Для выяснения характера влияния отдельных генов на генную сеть с помощью модели симулировались нокауты этих генов. При симуляции нокаутов вычислялись динамические предсказания модели вторым способом, однако при этом уровни экспрессии нокаутированных генов во все дни фиксировали на нулевых значениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ ПОЛНОЙ МОДЕЛИ

На первом этапе была обучена полная модель на совместной выборке, включающей данные для условий длинного светового дня и короткого светового дня (модель «Полная LD+SD» из табл. 2). Результирующая модель примерно одинаково хорошо описывает уровни экспрессии всех генов, и качество предсказаний модели примерно одинаково на обучающей и тестовой выборках (табл. 3).

Однако полученная таким образом модель имеет ряд недостатков. Динамические предсказания модели на усредненных входных данных, вычисленные с учетом данных на предыдущем дне (первый способ, описанный выше), хорошо соответствуют данным длинного дня (черные кривые на рис. 2). Средний по генам коэффициент корреляции между предсказаниями модели и данными в динамике равен $r = 0.84$ для LD и $r = 0.74$ для SD. Однако динамика усредненной экспрессии в модели при условиях LD значительно ухудшается при вычислении с учетом откликов модели на предыдущем дне (второй способ, описанный выше) (красные кривые на рис. 2; средний $r = 0.23$). В частности, уровень экспрессии *API* растет недостаточно сильно (рис. 2), и в целом падает корреляция между предсказаниями модели и данными. В условиях SD недостаток активации *API* проявляется в модели при любом способе вычисления динамики экспрессии, а для второго способа для всех генов, кроме *API*, в модели наблюда-

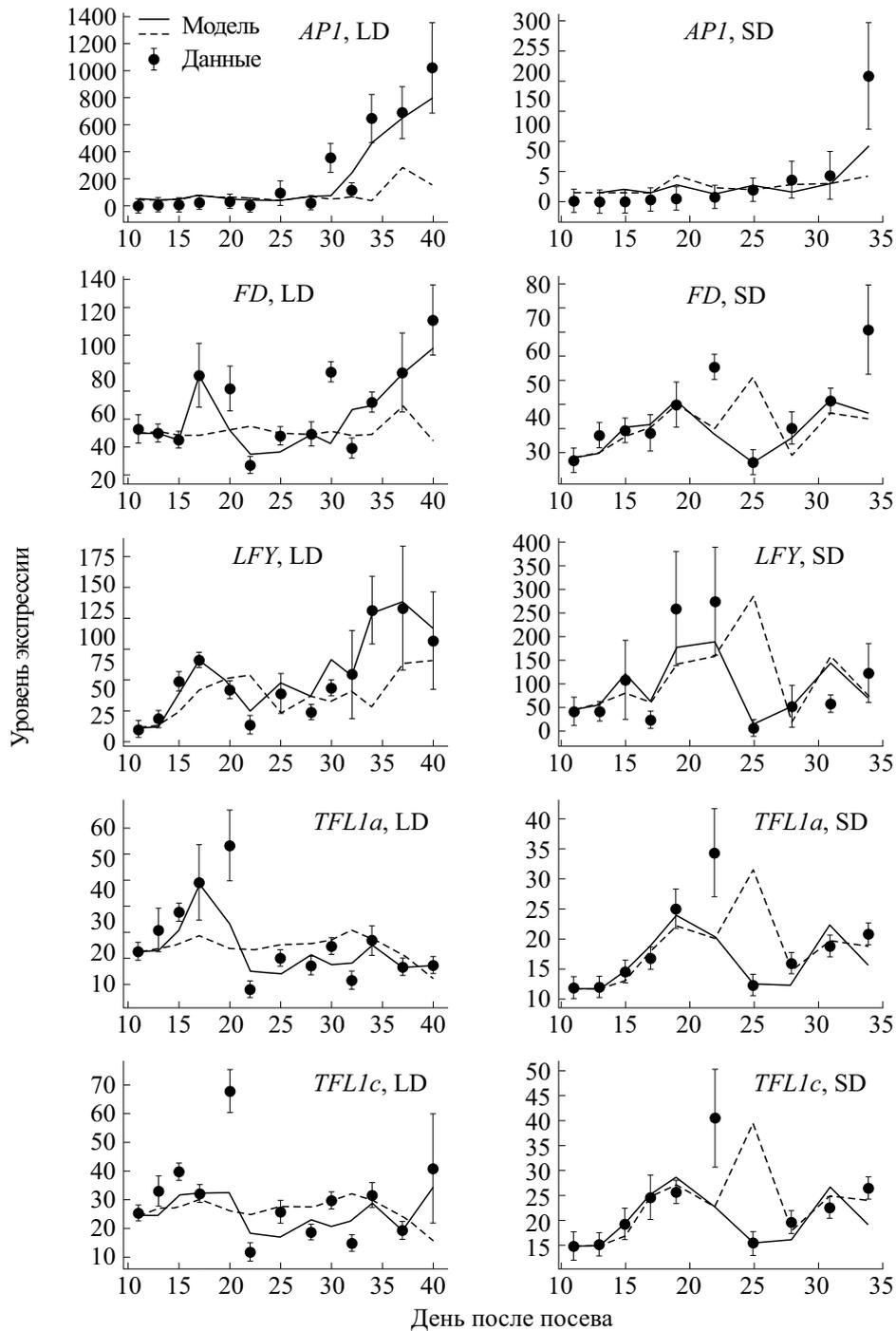


Рис. 2. Динамические предсказания полной модели, обученной на выборке LD+SD, в сравнении со средними уровнями экспрессии в данных. Черная кривая описывает динамику экспрессии в модели, вычисленную первым способом, описанным в тексте (предсказания в каждый день зависят от данных в предыдущий день). Пунктирная кривая показывает динамику экспрессии в модели, вычисленную вторым способом (предсказания в каждый день зависят от данных FT-генов и предсказаний модели для остальных генов в предыдущий день).

ется аномальное повышение экспрессии на 25-й день (рис. 2); также для второго способа корреляция между предсказаниями модели и данными низкая (средние $r = 0.74$ для первого способа и

$r = 0.24$ для второго способа вычисления динамики в условиях SD).

Из этого анализа можно сделать предположение о том, что модель не восприимчива к данным

Таблица 4. Результаты обучения и тестирования полной модели на LD-выборке

	НСКО		Коэффициент корреляции	
	Обучающая выборка	Тестовая выборка	Обучающая выборка	Тестовая выборка
<i>API</i>	0.042	0.073	0.96	0.90
<i>FD</i>	0.061	0.075	0.89	0.86
<i>LFY</i>	0.084	0.111	0.85	0.81
<i>TFL1a</i>	0.058	0.071	0.91	0.89
<i>TFL1c</i>	0.063	0.081	0.90	0.88

для условий короткого дня, и поэтому обучение модели на данных для LD и SD одновременно привело к недостаточно качественной динамике в модели и для условий длинного дня. В рамках такого предположения полная модель была обучена только на данных длинного дня (модель «Полная LD» из табл. 2). Результирующая модель показала хорошую степень близости к данным на обучающей и тестовой выборках (табл. 4). При этом, в отличие от случая обучения на объединенной выборке LD+SD, теперь модель хорошо предсказывает динамику усредненных уровней экспрессии всех генов для обоих способов вычисления такой динамики (рис. 3; средний $r = 0.99$ для первого способа и $r = 0.89$ для второго способа вычисления динамики).

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ УСЕЧЕННОЙ МОДЕЛИ

На следующем этапе была обучена усеченная модель, в которой явно учтены (как описано выше) только те взаимодействия между генами, которые присутствуют в генной сети зацветания у *Arabidopsis thaliana* (табл. 1) [15, 19]. Такая задача обусловлена общим предположением о консервативности этой генной сети у растений и, следовательно, направлена на проверку того, могут ли исследуемые данные экспрессии генов цветения у сорта нута CDC Frontier быть результатом функционирования в точности такой генной сети. Как и полная модель, усеченная модель обучалась отдельно на выборке LD+SD и только на LD-выборке.

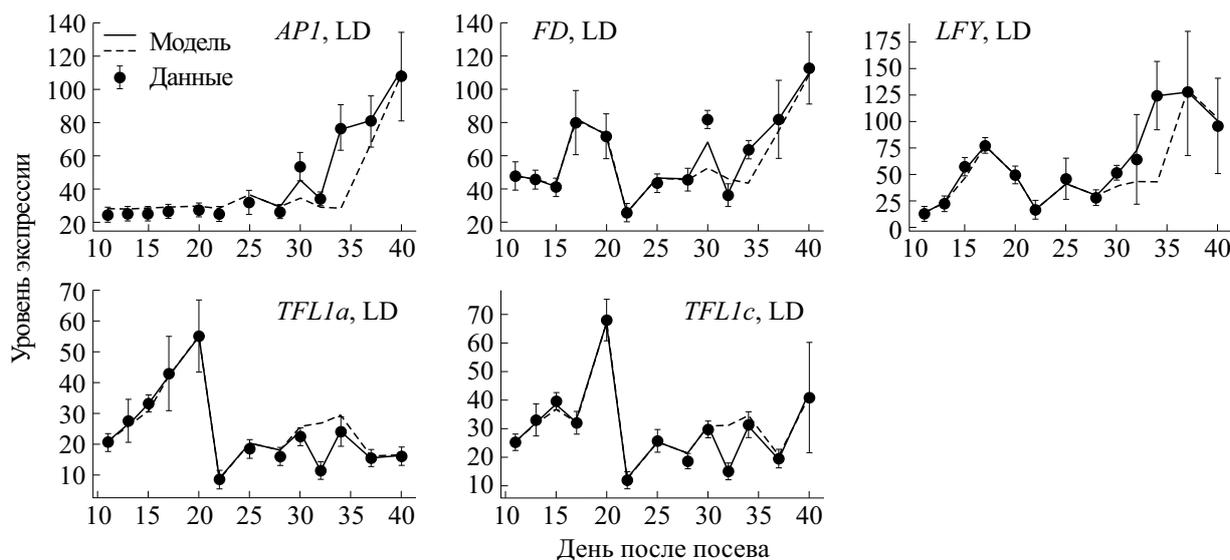


Рис. 3. Динамические предсказания полной модели, обученной на LD-выборке, в сравнении со средними уровнями экспрессии в данных. Все обозначения соответствуют рис. 2.

Таблица 5. Результаты обучения и тестирования усеченной модели на выборке LD+SD

	НСКО		Коэффициент корреляции	
	Обучающая выборка	Тестовая выборка	Обучающая выборка	Тестовая выборка
<i>API</i>	0.050	0.066	0.94	0.91
<i>FD</i>	0.141	0.145	0.44	0.44
<i>LFY</i>	0.067	0.086	0.85	0.74
<i>TFL1a</i>	0.138	0.143	0.30	0.30
<i>TFL1c</i>	0.148	0.151	0.27	0.25

Усеченная модель, обученная на данных для условий длинного светового дня и короткого светового дня (модель «Усеченная LD+SD» из табл. 2) показала достаточно хорошие корреляции на тестовой выборке для генов *API* и *LFY* и плохие корреляции для остальных генов (табл. 5). Анализ динамических предсказаний модели на усредненных данных показал значительные дефекты в динамике экспрессии (рис. 4). В частности, в отличие от данных, экспрессия *API* в модели падает в последний день наблюдений при условиях LD и демонстрирует повышенный уровень при условиях SD. В случае гена *LFY* динамика средней экспрессии достаточно хорошая в обоих условиях роста, но только в случае первого способа вычисления динамики в модели, тогда как для второго способа динамические предсказания в модели значительно ухудшаются (рис. 4). Остальные гены демонстрируют еще более значительные дефекты.

Гипотеза о плохой репрезентативности данных для условий SD была исследована также в контексте усеченной модели, по аналогии с тем, как это было сделано с полной моделью. Для этого усеченная модель была обучена только на LD-данных (модель «Усеченная LD» из табл. 2). Также, как и в случае обучения на выборке LD+SD, в результате были получены достаточно высокие коэффициенты корреляции между предсказаниями модели и данными на тестовой выборке только для экспрессии генов *API* и *LFY* (табл. 6). Анализ динамических предсказаний для средних уровней экспрессии в модели выявил дефекты в динамике, аналогичные описанным для усеченной модели, обученной на выборке LD+SD (рис. 5). Таким образом, в отличие от полной модели, в случае усеченной модели исключение данных короткого дня из обучающей выборки качественно не улучшило результаты обучения.

АНАЛИЗ НОКАУТОВ ГЕНОВ В МОДЕЛЯХ

Для определения характера влияния отдельного гена на экспрессию других в моделях вычисляли предсказания в условиях, когда этот ген выключен («нокаутирован»). Для этого сравнивались площади под графиком динамики экспрессии гена-мишени в модели для дикого типа и при нокауте. Увеличение этой площади при нокауте гена-регулятора соответствует репрессии (прямой или через другие регуляторные пути в генной сети) со стороны гена-регулятора, а уменьшение соответствует активации. Визуализация результатов таких вычислений для всех генов показывает, что модели воспроизводят большую часть регуляторных взаимодействий из генной сети для *Arabidopsis* (рис. 6).

Основной интерес представляет влияние потенциальных регуляторов на гены идентичности цветковых меристем *API* и *LFY*, поскольку экспрессия этих генов является маркером инициации цветения. Во всех моделях *TFL1*-гены оказывают репрессивное действие на эти гены в условиях LD, в то время как в условиях SD их влияние не столь однозначно (рис. 6). Среди *FT*-генов только *FTa3* проявляет себя как активатор *API* и *LFY* во всех моделях и в обоих условиях роста (LD и SD). Кроме того, *FTa3* является сильнейшим активатором для этих генов-мишеней среди всех *FT*-генов в условиях LD. Поскольку полная модель, обученная на LD-выборке, демонстрирует наиболее адекватную динамику средней экспрессии (рис. 3), для этой модели на рис. 7 показаны примеры динамики экспрессии гена *API* при выключении некоторых генов. В частности, *API* в этой модели очень слабо меняется при выключении всех *FT*-генов, кроме *FTa3*, и практически перестает экспрессироваться при выключении *FTa3* (рис. 7а). Также из двух репрессоров (*TFL1a* и

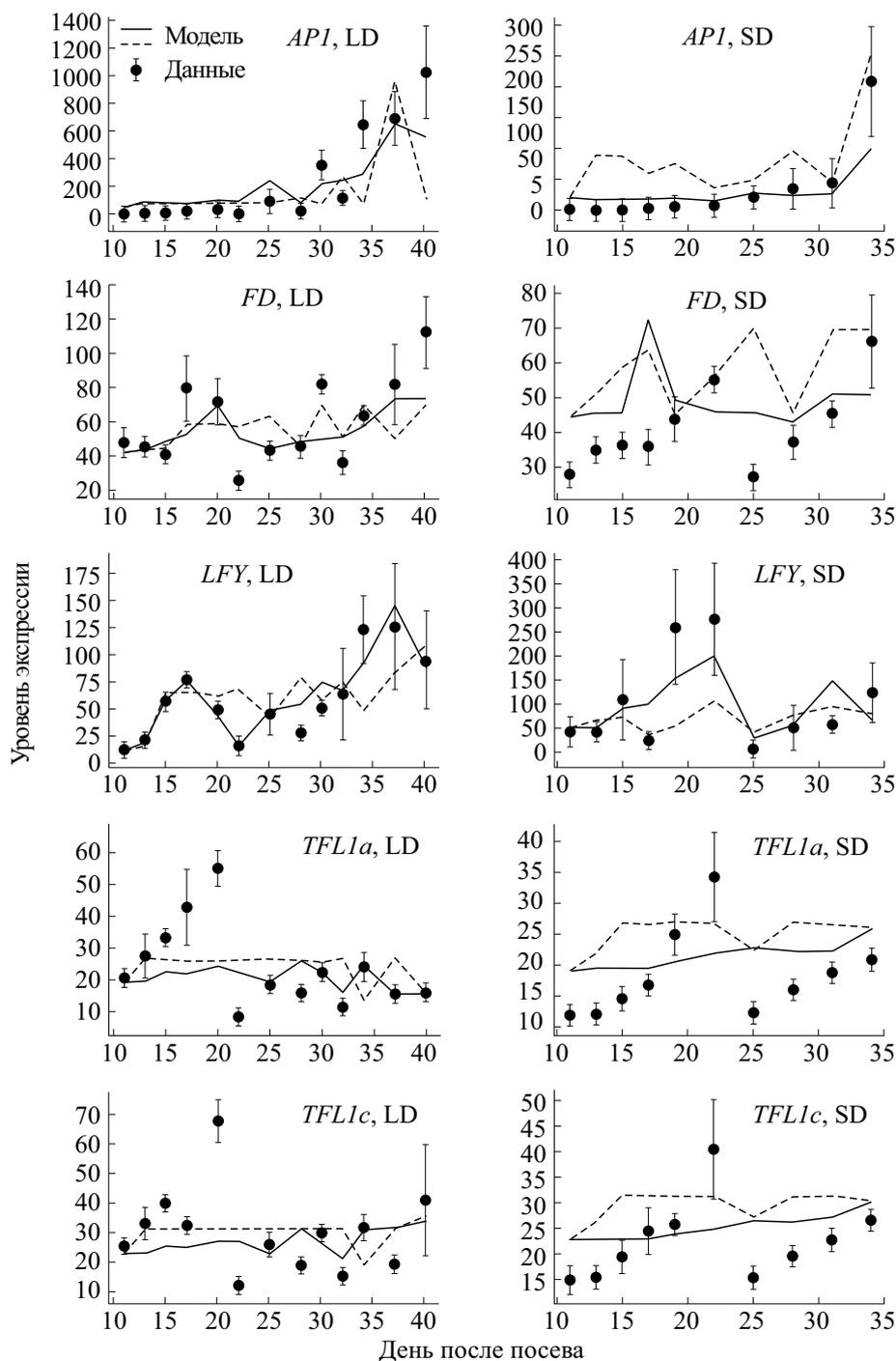


Рис. 4. Динамические предсказания усеченной модели, обученной на выборке LD+SD, в сравнении со средними уровнями экспрессии в данных. Все обозначения соответствуют рис. 2.

TFL1c) наиболее сильное влияние на *API* оказывает *TFL1c* (рис. 7в).

В соответствии с результатами, полученными ранее в рамках моделирования экспрессии генов цветения в сорте нута ICCV 96029 [19], представленные модели также предсказывают нарушение

в сорте CDC Frontier регуляторного модуля, состоящего из взаимной активации между *API* и *LFY*. Например, в полной модели, обученной на LD+SD выборке, в условиях LD *API* слабо репрессирует *LFY*, а в условиях SD *LFY* является сильным репрессором *API* (рис. 6). В полной мо-

Таблица 6. Результаты обучения и тестирования усеченной модели на LD-выборке

	НСКО		Коэффициент корреляции	
	Обучающая выборка	Тестовая выборка	Обучающая выборка	Тестовая выборка
<i>API</i>	0.050	0.075	0.94	0.90
<i>FD</i>	0.108	0.117	0.59	0.60
<i>LFY</i>	0.077	0.113	0.88	0.80
<i>TFL1a</i>	0.125	0.141	0.41	0.39
<i>TFL1c</i>	0.139	0.163	0.29	0.26

дели, обученной на LD-выборке, *LFY* является активатором *API* (рис. 7б), однако *API* слабо репрессирует *LFY* (рис. 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют применимость методов машинного обучения для анализа экспрессии генов цветения в нуте. Алгоритм случайного леса показывает хорошее качество обучения и тестирования на данных экспрессии в сорте нута CDC Frontier в условиях длинного дня. Построенные на этом обучении

модели позволяют вычислять динамику средних уровней экспрессии, которая хорошо соотносится с наблюдаемой динамикой в данных [14] в случае, когда данные используются как входные значения для предсказаний уровня экспрессии на следующий день. Этот результат контрастирует с плохими результатами предсказания такой динамики для сорта CDC Frontier, полученными ранее с помощью модели на основе дифференциальных уравнений [19].

Из четырех построенных моделей только полная модель, обученная на LD-выборке, позволяет корректно воспроизводить динамику средней

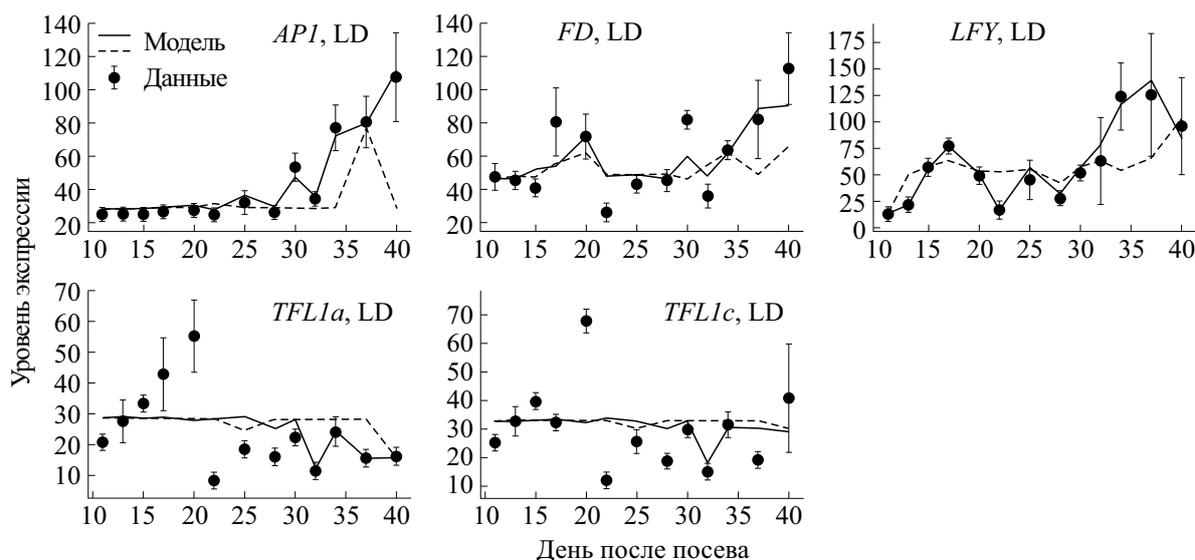


Рис. 5. Динамические предсказания усеченной модели, обученной на LD-выборке, в сравнении со средними уровнями экспрессии в данных. Все обозначения соответствуют рис. 2.

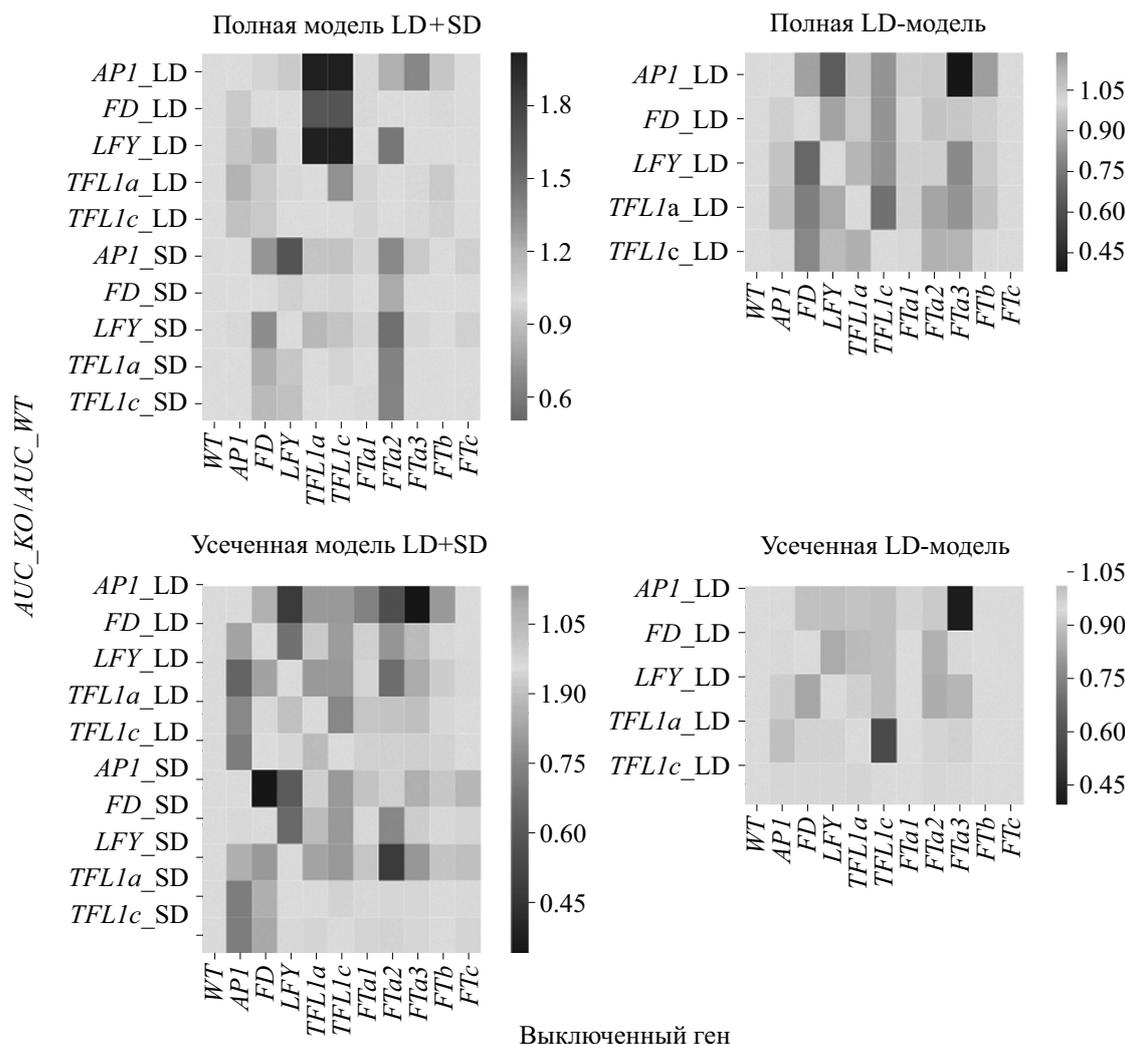


Рис. 6. Результаты моделирования нокауты генов. Для каждой из четырех моделей показано отношение площади под кривой динамики среднего уровня экспрессии гена-мишени в модели при одном выключенном гене-регуляторе (AUC_{KO}) к такой же площади для условий дикого типа, т. е. когда все регуляторы присутствуют в модели (AUC_{WT}), отдельно для условий SD и LD. Динамику экспрессии в модели вычисляли вторым способом, описанным в тексте. Значение $AUC_{KO}/AUC_{WT} > 1$ при выключенном регуляторе соответствует репрессии гена-мишени этим регулятором, а значения $AUC_{KO}/AUC_{WT} < 1$ – активации.

экспрессии в случае, когда такая динамика вычисляется не на основе данных в предыдущий день, а используя выходы самой модели в предыдущий день (кроме данных экспрессии *FT*-генов, являющихся внешними факторами в модели). Этот результат свидетельствует, что использование SD-данных в обучении скорее ухудшает качество предсказаний модели. Также модели, обученные с учетом и без учета данных короткого дня, предсказывают разный характер взаимодействий между генами. Таким образом, моделирование показывает, что SD- и LD-данные содержат качественно разную информацию, что, возможно, связано с наличием разных регуляторных взаимодействий в условиях короткого и длинного дня.

Наличие нескольких *FT*-генов и нескольких *TFL1*-генов в нуте ставит вопрос о функциональной роли отдельных гомологов и о характере потенциальной активации и репрессии генов цветения отдельными *FT*- и *TFL1*-генами соответственно. Из представленных результатов моделирования можно сделать предположение о ведущей роли *Fta3* в активации и *TFL1c* в репрессии генов идентичности цветковых меристем в условиях длинного дня. Как и для сорта нута ICCV 96029 [19], в случае CDC Frontier моделирование также выделяет взаимную активацию между *API* и *LFY* в качестве одного из регуляторных модулей, нарушение которого отличает нут от *Arabidopsis*. Общая изменчивость характера взаимодействий, наблюдающаяся между моделями,

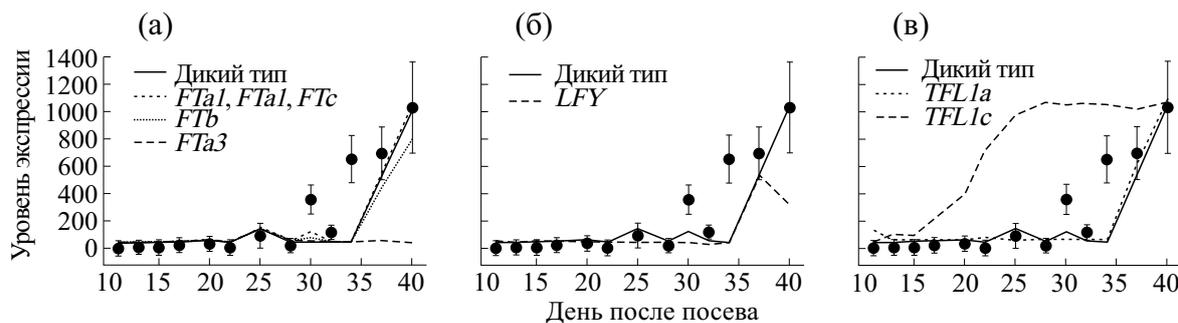


Рис. 7. Динамика экспрессии *API* в полной модели, обученной на LD-выборке, в условиях, когда один из следующих генов выключен: (а) — один из *FT*-генов, (б) — *LFY*-ген, (в) — один из *TFL1*-генов. Для сравнения на каждом графике также показана динамика экспрессии в диком типе (черная кривая). Название выключенных генов приведены на графиках рядом с цветом соответствующей кривой. Кривые, соответствующие нокауту каждого из генов *FTa1*, *FTa2* и *FTc*, показаны одной пунктирной линией в силу слабого различия между этими кривыми. Кривая дикого типа сливается с этими кривыми на графике (а).

построенными с учетом и без учета генной сети из *Arabidopsis*, вероятно, свидетельствует о недостаточности взаимодействий, лежащих в основе этой сети, для адекватного описания данных экспрессии генов цветения в CDC Frontier.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, задание № 1.8697.2017/БЧ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Jung and A. E. Müller, *Trends Plant Sci.* **14**, 563 (2009). DOI: 10.1016/j.tplants.2009.07.005
2. A. Kanth and M. Schmid, *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 2013 (2011). DOI: 10.1007/s00018-011-0673-y
3. M. Khan, X Ai, and J. Zhang, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **5**, 347 (2014). DOI: 10.1002/wrna.1215
4. J. A. Banta, I. M. Ehrenreich, S. Gerard, et al., *Ecol. Lett.* **15**, 769 (2012). DOI: 10.1111/j.1461-0248.2012.01796.x
5. F. Andrés and G. Coupland, *Nat. Rev. Genet.* **13**, 627 (2012). DOI: 10.1038/nrg3291
6. V. Hecht, F. Foucher, C. Ferrándiz, et al., *Plant Physiol.* **137**, 1420 (2005). DOI: 10.104/pp.104.057018
7. R. Benlloch, A. Berbel, L. Ali, et al., *Front. Plant Sci.* **6**, 543 (2015). DOI: 10.3389/fpls.2015.00543
8. J. L. Weller and R. Ortega, *Front. Plant Sci.* **6**, 207 (2015). DOI: 10.3389/fpls.2015.00207
9. C.-H. Jung, C. E. Wong, M. B. Singh, and P. L. Bhalla, *PloS One* **7**, e38250 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0038250
10. H. D. Upadhyaya, D. Bajaj, S. Das, et al., *Plant Mol. Biol.* **89**, 403 (2015). DOI: 10.1007/s11103-015-0377-z
11. J. L. Weller and R. C. Macknight, *Methods Mol. Biol.* **1822**, 261 (2018). DOI: 10.1007/978-1-4939-8633-0_17
12. R. Ortega, V. F. Hecht, J. S. Freeman, et al., *Front. Plant Sci.* **10**, 824 (2019). DOI: 10.3389/fpls.2019.00824
13. M. Blümel, N. Dally, and C. Jung, *Curr. Opin. Biotech.* **32**, 121 (2015). DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.023
14. S. Ridge, A. Deokar, R. Lee, et al., *Plant Physiol.* **175**, 802 (2017). DOI: 10.1104/pp.17.00082
15. K. E. Jaeger, N. Pullen, S. Lamzin, et al., *Plant Cell.* **25**, 820 (2013). DOI: 10.1105/tpc.113.109355
16. F. C. Sussmilch, A. Berbel, V. Hecht, et al., *Plant Cell.* **27**, 1046 (2015). DOI: 10.1105/tpc.115.136150
17. F. Valentim, S. van Mourik, D. Posé, et al., *PloS One* **10** (2), e0116973 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0116973
18. R. K. Varshney, C. Song, R. K. Saxena, et al., *Nat. Biotechnol.* **31**, 240 (2013). DOI: 10.1038/nbt.2491
19. V. V. Gursky, K. N. Kozlov, S. V. Nuzhdin, and M. G. Samsonova, *Front. Gen.* **9**, 547 (2018). DOI: 10.3389/fgene.2018.00547
20. F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, et al., *J. Machine Learning Res.* **12**, 2825 (2011).

Machine-Learning Analysis of Flowering Gene Expression in CDC Frontier Chickpea Cultivar

B.S. Podolny*, **V.V. Gursky****, and **M.G. Samsonova***

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg 195251 Russia*

***Ioffe Physical Technical Institute, Polytekhnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

We analyze gene expression dynamics in floral transition in the CDC Frontier chickpea cultivar. We provide a model, in several versions, to predict the expression dynamics of five flowering genes taking the expression of their regulators as the input. The models were trained using the random forest method on previously published expression data for ten flowering genes under the short- and long-day growing conditions. The resulting models correctly predict the dynamics of the average expression levels under long days. We show that the models for CDC Frontier mainly reproduce regulatory interactions between the key genes described for the model plant *Arabidopsis thaliana*. Based on the analysis, we hypothesize that the short-day data and the long-day data contain qualitatively different information, which can be related to different regulatory modules functioning in different conditions. For the regulators of the flower meristem identity genes AP1 and LFY, our models predict FTa3 as the main activator and TFL1c as the main repressor under long days.

Keywords: chickpea, CDC Frontier, flowering gene network, random forest algorithm

СЛЕДЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ В ГЕНОМАХ СТАРОМЕСТНЫХ СОРТОВ НУТА

© 2020 г. А.Б. Соколкова*, П.Л. Чанг**, Н. Карраскила-Гарсия**, Н.В. Нуждина***, Д.Р. Кук**, С.В. Нуждин*, ****, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29

**Факультет патологии растений Калифорнийского университета в Дэвисе, Дэвис, Калифорния 95616 США

***Факультет географии Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе, Лос-Анджелес, Калифорния 90095 США

****Университет Южной Калифорнии, СА 90089, Лос-Анджелес, США

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 04.12.2019 г.

После доработки 04.12.2019 г.

Принята к публикации 22.01.2020 г.

Банк семян Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) содержит многочисленные местные сорта, собранные почти сто лет назад, которые могут нести следы естественного отбора, действовавшего в ходе диверсификации сельскохозяйственных культур. В работе проведен анализ 407 местных сортов, собранных из основных исторических центров выращивания нута и вторичной диверсификации. Предложена гипотеза о том, что некоторые однонуклеотидные полиморфизмы связаны с сильным отбором к условиям окружающей среды, которые испытывал нут при одомашнивании и последующем географическом распространении. С помощью пакета BayPass определены 13 полиморфизмов, которые группируются по условиям среды и являются сильными кандидатами как маркеры локальной адаптации.

Ключевые слова: нут, биоклиматический анализ, генотипирование путем секвенирования, однонуклеотидные полиморфизмы, неравновесное сцепление.

DOI: 10.31857/S0006302920020088

В начале XX века (1911–1940) под руководством Н.И. Вавилова были предприняты систематические усилия по сбору и сохранению разнообразия культур, хранящихся в настоящее время в коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) в Санкт-Петербурге [1]. Географический разброс и генетическое разнообразие большинства культур, собранных в тот период, вероятно, должны отражать исторические условия их выращивания, сложившиеся в предшествующие тысячелетия. Особенно интересной представляется возможность идентифицировать следы в геноме исторического отбора на адаптацию к различным условиям окружающей среды [2].

В работе исследована такая возможность на данных для нута (*Cicer arietinum*), выращивание

которого в России в настоящее время быстро растет. Изначально нут был одомашнен примерно 10 тыс. лет назад в регионе Плодородного полумесяца (Ближний Восток) и затем распространился в Индию (~6000 лет назад), а также в Эфиопию и Северную Африку (~3000 лет назад) [3]. В ходе вторичной диверсификации нут стали культивировать в ряде новых сред, климатических условий и методов выращивания, что, по всей видимости, стало возможным благодаря селекции сегрегирующих в популяции мутаций или возникновению новых мутаций. Для проверки данной гипотезы были использованы методы биогеографии, геномики и вычислительной биологии, с помощью которых были идентифицированы конкретные гаплотипы, потенциально реагирующие на отбор. Полученные результаты могут быть использованы в будущем для улучшения сельскохозяйственных культур.

Сокращения: ОНП – однонуклеотидные полиморфизмы, SMS – оценка синтетической морфологии (Synthetic Morphology Score), BF – фактор Байеса (Bayes factor).

Таблица 1. Список биоклиматических ковариат и их сокращенные обозначения

Биоклиматическая ковариата	Сокращение
Среднегодовая температура, °С * 10	BIO ₁
Средняя разница между максимальной и минимальной температурами/день, °С * 10	BIO ₂
Изотермальность, %	BIO ₃
Температурная сезонность, стандартное отклонение * 100	BIO ₄
Макс. температура самого теплого месяца, °С * 10	BIO ₅
Мин. температура самого холодного месяца, °С * 10	BIO ₆
Среднегодовой диапазон температуры, °С * 10	BIO ₇
Средняя температура самого влажного квартала, °С * 10	BIO ₈
Средняя температура самого теплого квартала, °С * 10	BIO ₁₀
Средняя температура самого холодного влажного квартала, °С * 10	BIO ₁₁
Осадки за год, мм	BIO ₁₂
Осадки самого влажного месяца, мм	BIO ₁₃
Осадки самого сухого месяца, мм	BIO ₁₄
Сезонность осадков, мм	BIO ₁₅
Осадки самого влажного квартала, мм	BIO ₁₆
Осадки самого сухого квартала, мм	BIO ₁₇
Осадки самого теплого квартала, мм	BIO ₁₈
Осадки самого холодного квартала, мм	BIO ₁₉
Цифровая модель рельефа, м	DEM

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический материал и геномные данные.

Данные были получены из растений, произрастающих в таких странах, как Эфиопия, Ливан, Марокко, Турция, Индия и в более широких регионах Центральной Азии и Средиземноморья. Данные генотипирования путем секвенирования и однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) были взяты из работы [4]. Все данные Illumina доступны в базе данных Национального центра биотехнологий, код BioProject PRJNA388691. ОНП были выделены с использованием GATK pipeline [5] и далее отфильтрованы с помощью VCFtools [6]. 2579 ОНП прошли все фильтры, 407 образцов остались для дальнейшего анализа.

Генетический и биоклиматический анализ. Пакет BayPass [7] был применен для идентификации

генетических маркеров, связанных с биоклиматическими переменными, специфичными для конкретной местности. Для каждой биоклиматической переменной (см. табл. 1) вычислялись средние значения отдельно для каждой из шести географически различных групп. Поскольку многие биоклиматические переменные сильно коррелированы, средние значения каждой из пяти групп сильно коррелированных переменных заменяли оценкой синтетической морфологии (Synthetic Morphology Score, SMS), которая является первой главной компонентой данных (табл. 2). Три биоклиматические переменные не были сильно коррелированы с любыми другими переменными, поэтому их средние значения использовались в анализе без преобразований. Таким образом, были построены восемь перемен-

Таблица 2. Оценки синтетической морфологии, вычисленные на основании биоклиматических ковариат

Оценки синтетической морфологии	Биоклиматические переменные
SMS1	BIO ₁ , BIO ₃ , BIO ₆ , BIO ₈ , BIO ₁₁ , BIO ₁₅
SMS2	BIO ₁₂ , BIO ₁₃ , BIO ₁₆ , BIO ₁₈
SMS3	BIO ₅ , BIO ₁₀



Анализ ассоциаций с помощью BayPass. ОНП со значением BF > 15 показаны треугольниками. Когда одна позиция ассоциируется с рядом биоклиматических ковариат с разным BF, представлен только наиболее значимый ОНП. Внизу манхэттенского графика показана плотность распределения ОНП вдоль хромосом.

ных для исследования ассоциации с генетическими признаками с помощью BayPass. Анализ проводили в предположении о независимости переменных. Каждый ОНП оценивали с помощью алгоритма выборки по значимости [7], который вычисляет значение фактора Байеса (Bayes Factor, BF), эмпирическое значение P -value и соответствующие регрессионные коэффициенты. Ассоциации считались значимыми при эмпирическом значении P -value больше четырех. Чтобы количественно оценить силу ассоциации ОНП с переменными, была использована шкала оценки фактора в соответствии с правилом Джеффриса [8]: «очень убедительное доказательство» при $15 < BF < 20$ и «решающее доказательство» при $BF > 20$. Манхэттенские графики были выполнены в R с использованием библиотеки CMplot [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

407 образцов были разделены на шесть отдельных групп, отражающих географическое положение: Эфиопия («ETH»), Индия («IND»), Ливан («LEB»), Марокко («MOR»), Турция («TUR») и Центральная Азия («UZB»). Тест Манна–Уитни–Уилкоксона [10] использовали для выявления различий между группами по каждой биоклиматической ковариате.

Был проведен анализ ассоциаций найденных ранее 2579 ОНП с градиентами окружающей среды, с использованием пакета BayPass [7]. Этот пакет может идентифицировать генетические маркеры, связанные с популяционными переменными, такими как биоклиматические переменные в местах сбора. В соответствии с рекомендациями авторов пакета BayPass для каждой из шести географически различных групп были построены восемь ковариат: пять оценок синтетической мор-

фологии (табл. 1 и 2) и три усредненные некоррелированные ковариаты (BIO_{2_av}, BIO_{19_av}, DEM_av). Каждая SMS представляет собой линейную комбинацию усредненных значений коррелированных биоклиматических ковариат, которая имеет максимально возможную дисперсию. SMS1, SMS3 и SMS5 соответствуют биоклиматическим ковариатам температуры, тогда как SMS2 и SMS4 соответствуют биоклиматическим переменным осадков. Для оценки значимости ассоциации были использованы следующие критерии: эмпирическое байесовское P -value больше четырех и (согласно правилу Джеффриса [8]) $BF > 15$.

Анализ ассоциаций с помощью BayPass выявил тринадцать ОНП, достоверно связанных с ковариатами (рис. 1). Восемь ОНП на хромосоме 1 и один ОНП на хромосоме 2 были связаны с переменной BIO_{2_av}, представляющей среднюю разницу между максимальной и минимальной температурами в один день. Эти восемь ОНП на хромосоме 1 локализованы в области длиной 115 т.п.н. с сильным неравновесным сцеплением. Только один ОНП был связан с SMS5 (Ca4: 30608189). SMS4 ассоциирован с двумя ОНП на хромосоме 1 (Ca1: 23621481) и хромосоме 3 (Ca3: 36690022). Переменные SMS1 и SMS3, которые включают температурные характеристики, были совместно ассоциированы с одним ОНП на хромосоме 8 (Ca8: 10314452).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение многих тысячелетий фермеры и селекционеры занимались отбором культур с желаемыми фенотипами [11]. Объединяя экологические и геномные данные, теперь можно иденти-

фицировать гаплотипы, отобранные местными фермерами. В этой работе мы идентифицировали 13 однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с биоклиматическими переменными в местах сбора образцов и маркирующих районы генома, которые по всей видимости испытали действие отбора, направленного на адаптацию к региональным условиям выращивания при вторичной диверсификации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Биоклиматический и биогеографический анализы, а также анализ с помощью BayPass были выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-16-00007 (АБС, СВН, МГС)). Работа была также поддержана соглашением о сотрудничестве от Агентства США по международному развитию в рамках программы «Накорми будущее» AID-OAA-A-14-00008 (ДРК, ПЛЧ, СВН), Фондом Зумберджа (СВН) и грантом IOS-1339346 от Программы генома растений Национального научного фонда США (ДРК).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. А. Вишнякова, М. О. Бурляева, С. В. Булынец и др., С.-х. биология **52** (5), 976 (2017).
2. E. Plekhanova, M. A. Vishnyakova, S. Bulyntsev, et al., *Sci. Rep.* **7**, 4816 (2017).
3. R. J. Redden and J. D. Berger, in *Chickpea Breeding & Management*, Ed. by S. S. Yadav, R. Redden, W. Chen, and B. Sharma (CABI, Wallingford, UK, 2007), pp. 1–13.
4. E. J. von Wettberg, P. L. Chang, A. Greenspan, et al., *Nature Comm.* **9**, Art. Nu. 649 (2018). doi: 10.1038/s41467-018-02867-z.
5. A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, et al., *Genome Res.* **20**, 1297 (2010).
6. P. Danecek, A. Auton, G. Abecasis, et al., *Bioinformatics* **27**, 2156 (2011).
7. M. Gautier, *Genetics* **201**, 1555 (2015).
8. H. Jeffreys, *Theory of Probability*, 3rd ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, 1961).
9. *CMplot: Circle Manhattan Plot*. URL: <https://github.com/YinLiLin/R-CMplot> [Accessed: 20th June 2018].
10. H. B. Mann and D. R. Whitney, *Ann. Math. Statistics* **18** (1), 50 (1947).
11. N. Maxted, M. E. Dooloo, and B. V. Ford-Lloyd, *Enhancing crop gene pool use: capturing wild relative and landrace diversity for crop improvement* (CABI, Oxfordshire, UK, 2016).

Signatures of Ecological Adaptation in Genomes of Chickpea Landraces

A.B. Sokolkova*, P.L. Chang**, N. Carrasquilla-Garcia**, N.V. Nuzhdina***, D.R. Cook**, S.V. Nuzhdin*, ****, and M.G. Samsonova*

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

**Faculty of Plant Pathology, University of California, Davis, CA 95616, USA

***Faculty of Geography, University of California, Los Angeles, CA 90095, USA

****University of Southern California, Los Angeles, CA 90089, USA

The seed bank of N.I. Vavilov All Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) contains a wide range of landraces, collected almost one hundred years ago, in which natural selection might leave signatures through crop diversification. In this study, we analysed 407 landraces, sampled at centres of the chickpea origin and at sites of secondary diversity. We hypothesize that a fraction of single nucleotide polymorphisms might have exhibited strong selection to a range of environmental conditions that chickpea experienced during domestication and subsequent geographic distribution. Applying BayPass package we identified 13 polymorphisms; they assort by environmental conditions and are strong local adaptation candidates.

Keywords: chickpea, bioclimatic analysis, sequencing genotyping, single nucleotide polymorphisms, linkage disequilibrium

УДК 519.876.5

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРОДУКТИВНОСТЬЮ И СОДЕРЖАНИЕМ БЕЛКА И МАСЛА У СОИ

© 2020 г. А.А. Канапин*, **, А.Б. Соколкова*, А.А. Самсонова*, **, А.В. Щегольков***, С.В. Болдырев****, А.Ф. Аюпова****, Ф.Е. Хайтович****, С.В. Нуждин*****, М.Г. Самсонова*

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, С.-Петербург, Политехническая ул., 29

**Санкт-Петербургский университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

***Компания «Соевый комплекс», 350038, Краснодар, ул. Филатова, 19/2

****Сколковский институт науки и технологий, 143026, Москва, ул. Нобеля, 3

*****Университет Южной Калифорнии, СА 90089, Лос-Анджелес, США

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 20.12.2019 г.

После доработки 20.12.2019 г.

Принята к публикации 22.01.2020 г.

Подходы, основанные на учете биоразнообразия, находятся на переднем крае создания новых сортов в соеводстве. В этой статье с помощью полногеномного поиска ассоциаций проведен анализ естественной вариабельности в популяции сортов культурной сои, используемых в отечественной селекции. Идентифицированы районы генома, контролирующие содержание белка и масла в семенах, а также продуктивность, из которых многие не были описаны ранее. Полученные результаты открывают путь к созданию новых маркеров для маркерной селекции этой культуры.

Ключевые слова: соя, полногеномный поиск ассоциаций, продуктивность, содержание белка и масла в семенах.

DOI: 10.31857/S000630292002009X

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) — один из самых динамичных и перспективных в России агрокультур, биологический потенциал которого сейчас почти не ограничен. Одним из ключевых требований времени к селекции сортов сои является проблема качества — содержание белка и масла в семенах, а также повышение продуктивности. Современные технологии молекулярного маркирования и полногеномного поиска ассоциаций могут значительно ускорить этот процесс.

Эти технологии используют результаты полногеномного секвенирования или генотипирования путем секвенирования (genotyping by sequencing, GBS). Генотипирование путем секвенирования — сравнительно дешевый метод, который «прочитывает» многочисленные короткие участки генома, позволяет выявить полиморфные позиции и тем самым охарактеризовать генетическое разнообразие и структуру популяции изучаемого вида [1]. Другим типом данных, необходимых для полногеномного поиска ассо-

циаций, являются данные фенотипирования. Технология полногеномного поиска ассоциаций делает возможной идентификацию локусов количественных признаков, контролирующих фенотипическую изменчивость по агрономически важным признакам, на основе которых затем могут быть разработаны маркеры для маркерной селекции [2]. Полногеномный поиск ассоциаций и маркерная селекция особенно эффективны в случае локусов большого эффекта, контролирующих просто наследуемые количественные признаки. В случае количественных, сложных признаков, контролируемых большим числом генов малого эффекта и зависящих от внешней среды, разработаны статистические методы предсказания селекционной ценности растений с использованием всей информации об изменчивости генома.

Селекция на качество у бобовых усложняется взаимодействием признаков, зависимостью их от внешней среды и значительным взаимодействием генотип × среда [3]. Значительные отрицательные корреляции были обнаружены между урожайностью и содержанием белка в семенах сои, а также между содержанием белка и масла, в то вре-

Сокращения: ОНП — однонуклеотидные полиморфизмы, QTL — локусы количественных признаков.

мя как урожайность и масло коррелируют положительно [4]. Было также показано, что условия культивирования влияют на эти признаки [5].

За истекшее двадцатилетие обнаружено много участков генома, контролирующих продуктивность и содержание белка и масла в семенах [3]. Однако из-за их частого плейотропного действия на отрицательно коррелированные признаки, а также из-за отсутствия у них большого эффекта и стабильности очень немногие из этих участков были далее использованы или включены в селекционные программы.

Генетическая основа современных сортов сужена многолетней селекцией, и одним из подходов к увеличению разнообразия, столь важного для селекции, является интрогрессия материала диких образцов или староместных сортов, широко используемых до начала «зеленой» революции. Неоценимым источником такой информации являются образцы коллекции ВИР (Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова) — самой большой в Европе и содержащей уникальный материал из всех соеосеющих районов мира и для всех направлений использования этой высокобелковой культуры: пищевого, кормового и технического.

В этой статье методы геномики и биоинформатики были применены для описания генетического разнообразия образцов сои коллекции ВИР и современных культурных сортов, а также для идентификации участков генома, ассоциированных с хозяйственно важными признаками продуктивности — количеством белка и масла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. Исследуемая выборка из 280 сортов состояла из 121 образца сои коллекции ВИР (114 сортов *G. max*, 2 образца *G. gracilis* и 5 образцов мутантов и гибридов *G. soja*) и 160 образцов сои *G. max* коллекции компании «СоКо» (79 современных сортов и 80 линий из предварительного сортоиспытания).

Выращивание. Посев сортов и линий сои был произведен в Центральной зоне Краснодарского края 1 мая. Расстояние между рядами 70 см, расстояние между семенами 3 см. Почвенный покров экспериментального участка представлен выщелоченным слабогумусным сверхмощным тяжелосуглинистым черноземом. В целом почва обладает благоприятными водно-физическими свойствами и химическим составом для выращивания всех сельскохозяйственных культур, в том числе сои. Предшественник — озимая пшеница. Агротехника сои на экспериментальном участке — рекомендованная для данной зоны выращивания. Посев осуществлялся механизированно с помощью селекционной кассетной сеялки. Всего

опыт включал 191 четырехрядную делянку площадью 14 м² каждая. Все сортообразцы высеяны в двухкратной повторности. Кроме того, 139 сортообразцов, полученных от Всероссийского института генетических ресурсов им. Н.И. Вавилова, с ограниченным числом семян были высеяны на однорядных делянках площадью 3.5 м² без повторностей. Общая площадь участка под опытом составила 0.8 га. В период вегетации сои были проведены визуальные наблюдения за растениями, заключающиеся в фиксировании дат появления всходов и полного созревания для определения продолжительности вегетационных периодов исследуемых сортообразцов. Уборочные работы на экспериментальном опытном участке были проведены при полном созревании растений. Основаниями для назначения сроков уборки являются: опадение листьев, подсыхание вегетативных частей растения и снижение влажности семян до 14%. На четырехрядных делянках уборка проведена путем прямого комбайнирования с использованием селекционного комбайна. Скашиванию комбайном подвергали два средних (учетных) ряда четырехрядной делянки. Боковые ряды делянки не убирали — они являются защитными, так как испытывают влияние соседних делянок. Растения с однорядных делянок срезали вручную (серпом), формировали в снопы и затем обмолачивали с помощью селекционного комбайна.

Фенотипирование растений. Полученные семена были очищены от сорной примеси и взвешены с определением влажности. Продуктивность сортов (г/м²) устанавливали путем деления массы семян с делянки при пересчете на стандартную (14%-ю) влажность на учетную площадь. Для определения биохимического состава семян (содержание белка и масла в процентах) использовали спектрометр ближней инфракрасной области, анализы на котором осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 32749-2014. Анализ проводили на целых (неразрушенных) семенах, которые помещали в прибор в стандартных кюветках. Масса анализируемой навески семян составляла 8–10 г (40–60 шт.), время измерения одного образца — 30 с. Для получения достоверного результата были выполнены три параллельных измерения одного образца.

Генотипирование образцов. Геномная ДНК была разрезана двумя рестриктазами — *HindIII* и *NlaIII*. Использовали два типа адаптеров — баркоды, которые пришивали к концам, образованным разрезанием *HindIII*, и второй общий адаптер, который пришивали к свесам, образовавшимся при действии *NlaIII*. Количество полученных библиотек оценивали при помощи флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США) и высокочувствительного набора для оценки concentra-

ции ДНК (Qubit DNA HS Assay Kit). Качество полученных библиотек оценивали на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc., США) с использованием высокочувствительного набора Agilent High Sensitivity DNA Kit. Секвенирование образцов, подготовленных по методу генотипирования путем секвенирования, проводили на секвенаторе HiSeq400 (Illumina, США) со следующими установками: длина прочтения – 150 нуклеотидов, парные чтения, длина индексного чтения – 7 нуклеотидов. По завершении запуска проводили конверсию в формат fastq с помощью программы bcl2fastq. Оценку качества файлов fastq проводили с помощью программы AfterQC [6], версия 0.9.6. Прочтения Illumina выравнивали на референсный геном сои G.max Wm82.a2.v1 с использованием программы bowtie2, версия 2.3.4.3 и параметров, взятых по умолчанию [7]. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) выполнен программой NGSEP [8]. Фильтрация ОНП выполнена стандартно с сохранением полиморфизмов, отвечающих условиям Mapping Quality (MQ) > 40. Дальнейшая фильтрация ОНП выполнена с использованием VCFtools [9] и заключалась в выборе вариантов, у которых частота минорной аллели была больше 1%, а представленность образцов была выше 85%. Результирующее количество ОНП составило 2385.

Анализ фенотипических данных. Тест Шапиро–Уилка на нормальность [10] был применен к количественным фенотипическим признакам. Коэффициенты корреляции Спирмена для признаков были рассчитаны с использованием функции «scoff» из библиотеки «Hmisc» R [11].

Оценка величины неравновесного сцепления. Неравновесное сцепление оценивали, вычисляя квадрат коэффициента корреляции (r^2) между генотипами. VCFtools [9] был использован для расчета внутрихромосомных значений r^2 и значений r^2 между ОНП на разных хромосомах. Неравновесное сцепление оценивали путем построения графика внутрихромосомных значений r^2 относительно физического расстояния (т.п.н.) между маркерами в R [12]. В качестве критического значения r^2 была принята 95 перцентиль значений r^2 между ОНП на разных хромосомах после трансформации с использованием квадратного корня. Убывание неравновесного сцепления оценивали путем построения регрессионной линии, используя подход Хилла и Вайра [13]. Пересечение регрессионной линии внутрихромосомных значений r^2 с пороговым значением r^2 считалось оценкой величины неравновесного сцепления.

Анализ структуры популяции. Структуру популяции образцов анализировали методом главных компонент (библиотека в R SNPRelate [14]) и с помощью пакета программ на языке R LEA [15].

Во втором анализе выбор количества субпопуляций был основан на критерии кросс–энтропии. Этот критерий основан на прогнозировании доли замаскированных генотипов (завершение матрицы) и на методе перекрестной проверки. Меньшие значения критерия кросс–энтропии обычно означают лучшие запуски. Для каждого смоделированного значения K в диапазоне от 1 до 10 были выполнены десять независимых запусков. Было выбрано значение K , для которого кривая кросс–энтропии выходит на плато ($K = 6$). Индивидуальный образец с более чем 55%-й идентичностью к одной из субпопуляций классифицировали как принадлежащий этой субпопуляции.

Поиск ассоциаций. Полногеномный поиск ассоциаций был выполнен с использованием однолокусной линейной смешанной модели, реализованной в пакетах программ plink (версия 1.9) [16] и rMVP (версия 0.99.17) (<https://cran.r-project.org/web/packages/rMVP/index.html>). Анализ 2385 ОНП методом главных компонент показал, что первые пять из них объясняют 36% дисперсии всех маркеров. Однолокусная модель была реализована с использованием первых пяти компонент в качестве ковариант для всех фенотипических данных. Для обнаружения значимых ассоциаций между признаком и ОНП использовали значение частоты ложного обнаружения [17], равное 0.05. Для дальнейшего анализа были использованы только варианты, для которых статистически надежная ассоциация с фенотипическим признаком была подтверждена обоими программными пакетами. С помощью базы данных Legume information system [18] была произведена аннотация значимо ассоциированных ОНП.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипический анализ образцов. По всей изученной выборке в среднем продуктивность равнялась 160.8 г/м², содержание белка – 41.3%, содержание масла 21.3%. Для образцов коллекции ВИР средние значения этих фенотипических признаков 116.8 г/м², 41.9%, 20.1% соответственно, для образцов коллекции компании «СоКо» – 182.5 г/м², 40.9%, и 21.2%, а для линий из предварительного сортоиспытания этой компании – 205.1 г/м², 41.2% и 22.8%.

Признак продуктивности имеет среднюю положительную корреляционную связь с содержанием масла (коэффициент корреляции Спирмена, $r = 0.6$) и слабую отрицательную корреляционную связь с содержанием белка (коэффициент корреляции Спирмена, $r = -0.21$). Кроме того, признак содержание белка имеет среднюю отрицательную корреляционную связь с содержанием масла (коэффициент корреляции Спирмена, $r = -0.4$).

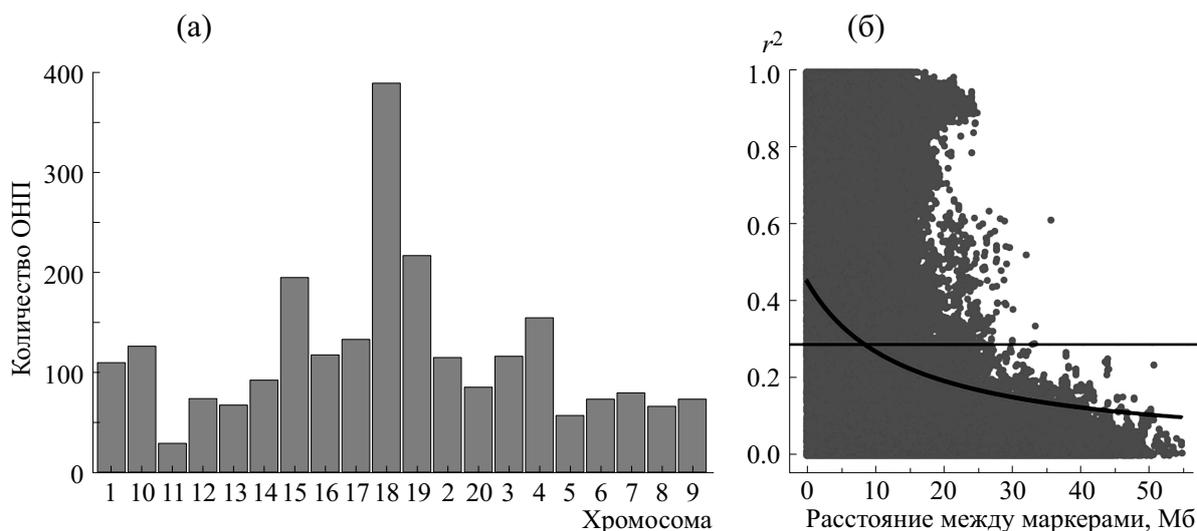


Рис. 1. (а) – Распределение снипов по 20 хромосомам генома сои. (б) – График неравновесного сцепления (r^2) для сои. Горизонтальная черная линия соответствует 95 перцентили значений r^2 между ОНП на разных хромосомах после трансформации с использованием квадратного корня.

Анализ полиморфизмов. Идентификацию од- нонуклеотидных вариантов в геноме образцов проводили методом генотипирования путем секвенирования. Идентифицированные ОНП были отфильтрованы для сохранения полиморфизмов, присутствующих по меньшей мере в 85% генотипов и имеющих частоту минорной аллели по меньшей мере 1%. Из рис. 1а видно, что результи- рующие ОНП распределены по всем 20 хромосо- мам сои. Наибольшее число ОНП находится в 18-й, 19-й и 15-й хромосомах, которые не являют- ся самыми длинными по сравнению с остальны- ми хромосомами.

Достаточность набора маркеров для полноге- номного поиска ассоциаций прежде всего опре- деляется величиной неравновесного сцепления. В меньших популяциях преимущественно само- опыляющихся организмов дрейф и отбор обычно имеют более сильные эффекты, чем рекомбина- ция, и, таким образом, неравновесное сцепление распространяется на большие области генома. График неравновесного сцепления между поли- морфизмами образцов сои представлен на рис. 1б. В качестве критического значения было выбрано значение $r^2 = 0.29$. Регрессионная линия внутривхромосомных значений r^2 пересекает этот порог на физическом расстоянии примерно в 8.4 млн п.н. (рис. 1б).

Анализ структуры популяции. Характер диффе- ренциации популяции был проанализирован ме- тодом главных компонент и визуализирован с по- мощью неукорененных филогенетических дере- вьев. На рис. 2а показан график, полученный методом главных компонент для первой и второй главных компонент, объясняющих изменчивость

генетических данных. Как видно, образцы линий «СоКо» из предварительного сортоиспытания и образцы дикой сои и ее мутантов и гибридов об- разуют отдельные группы, а образцы коллекций ВИР и компании «СоКо» группируются вместе. В результате анализа в R-пакете LEA [15], в котором выбор количества субпопуляций основан на кри- терии кросс-энтропии, были выделены шесть субпопуляций (рис. 2б). При использовании 55% в качестве порога для отнесения образца к одной из субпопуляций 205 (62.5%) образцов были отне- сены к одной из шести групп (табл. 1). Оставшие- ся образцы являются результатом адмиксии, их не удалось однозначно отнести ни к одной из суб- популяций. К первой субпопуляции относятся образцы компании «СоКо», вторая субпопуляция преимущественно состоит из образцов коллек- ции ВИР и линий компании «СоКо». Третья и пя- тая субпопуляции, за исключением нескольких образцов полностью состоит из линий компании «СоКо». Четвертая и шестая субпопуляции пре- имущественно состоят из образцов коллекций ВИР и компании «СоКо», которые, как видно на рис. 2а, группируются вместе.

Анализ отдельных признаков. Полногеномный поиск ассоциаций был реализован с использова- нием первых пяти компонент в качестве ковари- ант для всех фенотипических данных в пакетах программ plink (версия 1.9) и gMVP (версия 0.99.17). Лучший тип анализа был выбран для каждого признака в отдельности на основе пара- метра геномного контроля (λ_{GC}).

Мы обнаружили 61 ОНП, значимо ассоцииро- ванный с содержанием масла в семенах, 63 ОНП, значимо ассоциированных с продуктивностью, и

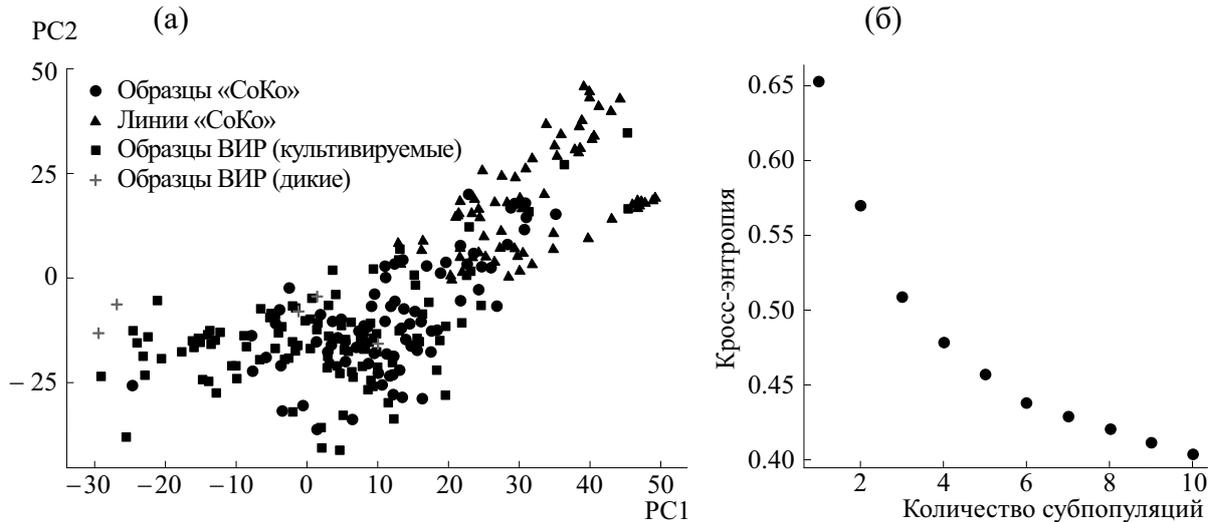


Рис. 2. (а) – График, полученный методом главных компонент для первой и второй главной компонент. (б) – График кросс-энтропии для образцов сои. Для каждого смоделированного значения K в диапазоне от 1 до 10 были выполнены десять независимых запусков. Было выбрано значение K , для которого кривая кросс-энтропии выходит на плато ($K = 6$).

35 ОНП, значимо ассоциированных с содержанием белка в семенах (рис. 3). Из них 25 ОНП имеют плейотропный эффект: 2 ОНП положительно и 13 ОНП отрицательно влияют на содержание масла в семенах и продуктивность, 10 ОНП положительно влияют на содержание белка и отрицательно на содержание масла в семенах, 4 ОНП, наоборот, – положительно на содержание масла и отрицательно на содержание белка в семенах. При этом 7 ОНП значимо ассоциированы со всеми тремя фенотипическими признаками.

Аннотация областей генома, где расположены значимые ОНП, показала, что внутри последовательностей известных генов находится 14, 5, 2 и 16 ОНП, значимо ассоциированных с содержанием масла в семенах, белка в семенах, масла и белка в семенах и с продуктивностью соответственно (табл. 2).

Из-за значительного неравновесного сцепления мы не можем однозначно идентифицировать причинно-следственные связи между этими

ОНП и фенотипами. Тем не менее мы исследовали потенциальную природу ассоциированных генов (табл. 2). Так, например, ген *Glyma.01g151300* содержит два ОНП, значимо ассоциированных с продуктивностью. Этот ген кодирует нодулин [19] и принадлежит суперсемейству вспомогательных белков (Major facilitator superfamily), осуществляющих транспорт широкого круга веществ через биомембраны [20]. ОНП *Gm04:6140945*, положительно влияющий на содержание масла в семенах и отрицательно – на содержание белка, находится внутри гена *Glyma.04g073700*, кодирующего амимонацил-тРНК-синтазу. ОНП *Gm15:10947679*, ассоциированный с содержанием масла в семенах, находится в гене *Glyma.15g135700*, кодирующем ацетил-КоА-синтазу, которая играет важную роль в деградации и синтезе липидов в семенах [21, 22]. Важную роль в биосинтезе жирных кислот играют 3-оксоацил [белок-переносчик ацил-группы] синтазы I, одну из которых кодирует ген *Glyma.05g129600*, в кото-

Таблица 1. Количество образцов в субпопуляциях

Образцы	Количество образцов в субпопуляциях						
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	Адмиксия
Образцы ВИР		29	1	20	4	17	58
Дикая соя и ее гибриды		4		1		1	3
Образцы компании «СоКо»	19	9	1	14	2	17	48
Линии компании «СоКо»		13	31		22		14

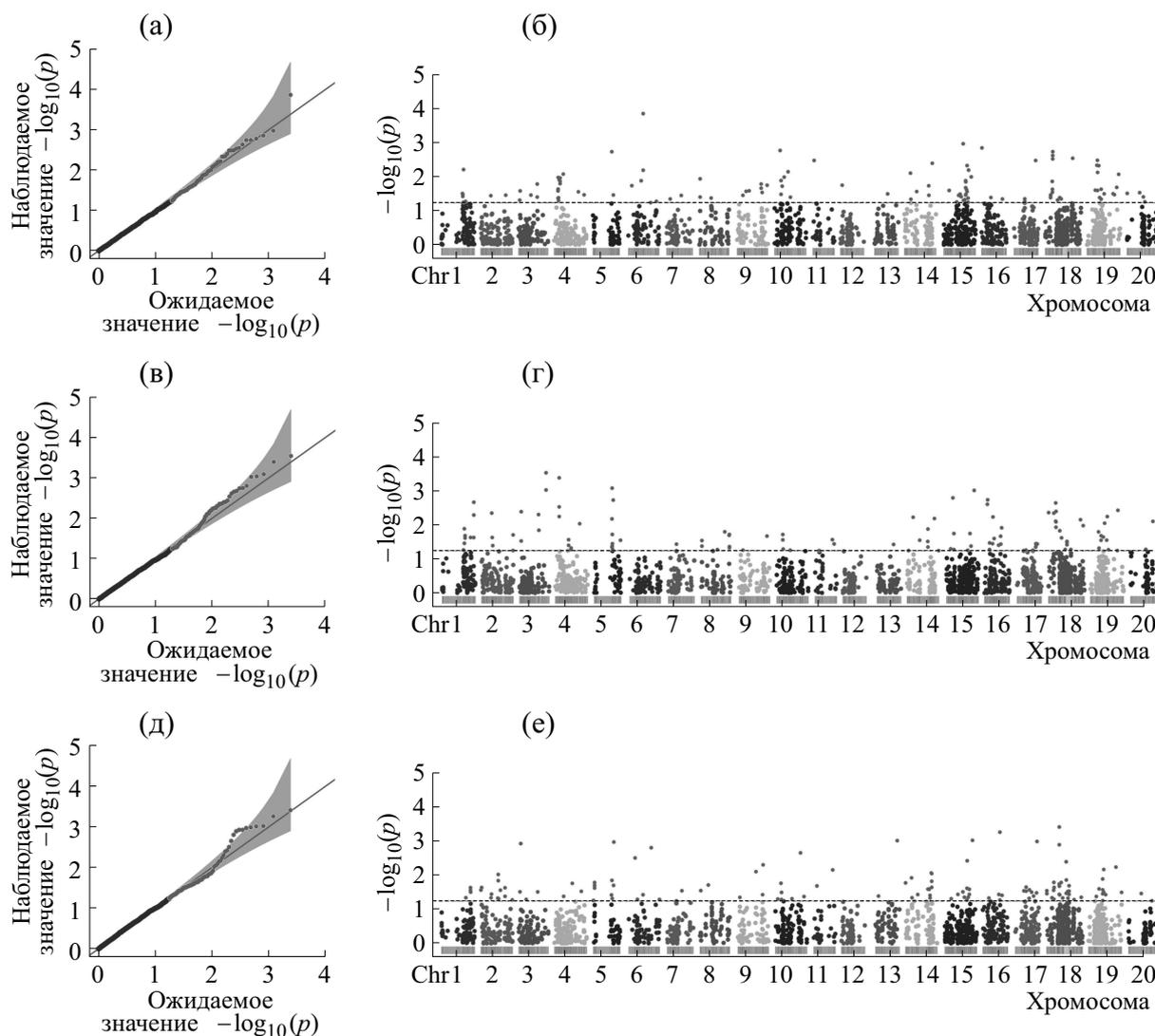


Рис. 3. (Результаты полногеномного поиска ассоциаций для продуктивности, содержания белка и масла в семенах. (а, в, д) – Графики QQ-plot для содержания масла, белка и для продуктивности. Эти графики показывают соответствие квантилей распределения значений q-статистики при справедливости нулевой гипотезы (отсутствие ассоциаций, нормальное распределение, X–ось) и квантилей распределения значений этой тестовой статистики, получаемым при тестировании (Y–ось). (б, г, е) – Манхеттановские графики для содержания масла, белка в семенах и продуктивности, X–ось – геномные координаты, Y–ось – отрицательный логарифм тестовой статистики ассоциации q для сиппов, которые обозначены точками. Значимо ассоциированные полиморфизмы расположены выше пунктирной линии.

ром находится ОНП Gm05:32274272, ассоциированный с продуктивностью [23]. Ген Glyma.02g017500, содержащий ассоциированный с продуктивностью ОНП GM02:1553466, кодирует фотолиазу – фермент, участвующий в фоторепарации. Этот фермент вырезает из ДНК пиримидиновые димеры, возникновение которых индуцирует ультрафиолетовое излучение [24]. Ассоциированный также с продуктивностью ОНП Gm14:140838 локализуется в гене Glyma.14g001200, который кодирует кальцийсвязывающий белок с доменом EF-рука. Ортолог этого гена у *Glycine soja* участвует в ответе растения на

солевой, осмотический и бикарбонатные стрессы [25]. ОНП Gm16:4345707, ассоциированный с содержанием белка в семенах, локализуется в гене Glyma.16g0045900, который кодирует синтаксин, белок, обеспечивающий специфичность слияния везикул при везикулярном транспорте [26]. ОНП Gm20:35399322, также ассоциированный с содержанием белка в семенах, локализуется в гене Glyma.20g111900, который кодирует транспортер катионов аминокислот [27]. У *A. thaliana* ген CAT9 транспортера катионов аминокислот 9 участвует в поддержании азот-зависимого гомеостаза аминокислот [28].

Таблица 2. Однонуклеотидные полиморфизмы внутри последовательностей известных генов

ОНП	Хромосома	Ген	Эффект	Признак	
1_48811028_T_C	1	GLYMA_01G151300	+		
1_48811056_G_A			+		
2_449825_A_C	2	GLYMA_02G003800	-	Продуктивность	
2_1553466_T_C		GLYMA_02G017500	-		
2_26061066_T_C		GLYMA_02G168900	+		
3_2161482_T_A	3	GLYMA_03G021000	+	Содержание масла	
			+		Продуктивность
4_6140945_T_C	4	GLYMA_04G073700	+	Содержание масла	
			-		Содержание масла
4_6163480_T_C			+		Содержание масла
			-		Содержание масла
5_31849296_T_G	5	GLYMA_05G125100	-	Продуктивность	
5_32274272_T_C		GLYMA_05G129600	-		
6_47133259_T_C	6	GLYMA_06G283400	+		
9_41467035_G_T	9	GLYMA_09G190100	+	Содержание масла	
10_12734575_T_C	10	GLYMA_10G092000	-	Продуктивность	
10_39381094_T_C		GLYMA_10G159500	-		
10_44728567_T_C		GLYMA_10G215100	+		
11_3245369_T_C	11	GLYMA_11G043800	-	Содержание масла	
11_30226778_T_C		GLYMA_11G210100	+		Продуктивность
13_27118432_G_C	13	GLYMA_13G156200	+	Содержание масла	
14_140838_G_A	14	GLYMA_14G001200	-	Продуктивность	
15_10947679_C_T	15	GLYMA_15G135700	-	Содержание масла	
16_659516_T_A		GLYMA_16G007900	+		
16_4345707_T_G		GLYMA_16G045900	-		
16_4782762_T_C		GLYMA_16G049900	-		
16_29296946_T_C	16	GLYMA_16G135500	+	Продуктивность	
			-		Содержание масла
			-		Содержание масла
18_12210395_C_T	18	GLYMA_18G107800	-	Продуктивность	
			-		
19_39885214_A_G	19	GLYMA_19G137500	-	Содержание масла	
19_45429114_G_A		GLYMA_19G197100	-		
19_48356373_T_A		GLYMA_19G233800	-		
20_35399322_G_C	20	GLYMA_20G111900	-	Содержание масла	

ОБСУЖДЕНИЕ

Подходы, основанные на учете биоразнообразия, находятся на переднем крае создания новых сортов в соеводстве. В этой статье с помощью полногеномного поиска ассоциаций проведен анализ естественной вариабельности в популяции сортов культурной сои, используемых в отечественной селекции, что в потенциале открывает путь к созданию новых маркеров для маркерной селекции этой культуры.

За истекшее двадцатилетие в многочисленных исследованиях обнаружено большое количество локусов количественных признаков (QTL), контролирующих содержание белка и масла в семенах и продуктивность, а также ОНП, ассоциированных с этими признаками [3]. Однако из-за отсутствия большого эффекта и стабильности, а также из-за негативной корреляции между содержанием белка и маслом /урожайностью и несогласованностью эффектов в разных условиях выращивания очень немногие из этих районов были далее использованы или включены в селекционные программы [29]. По данным Комитета по генетике сои (<http://www.soybase.org>), только два QTL, один на Хр. 15 (cqPro-15) и еще один на Хр. 20 (cqPro-20) обозначены как официально подтвержденные QTL, контролирующие содержание белка в семенах, и исследования подтвердили сегрегацию аллелей этих локусов во всех тестируемых популяциях (<http://soybase.org/>). QTL на Хр. 20 был в центре внимания нескольких исследований, в том числе по тестированию аллелей с высоким содержанием белка на разных генетических фонах, в этих экспериментах этот локус показал большой аддитивный эффект [5]. Важно, что в этом локусе обнаружены как аллели с отрицательной корреляцией между белком и продуктивностью, так и аллели с незначительным отрицательным влиянием на этот признак [30]. QTL на Хр. 20 также часто подтверждается при полногеномном поиске ассоциаций в различных популяциях зародышевой плазмы [2, 4, 31], хотя уровень значимости этого района варьировал между исследованиями.

Данные о локусах, одновременно контролирующих продуктивность и качество семян, немногочисленны. Обнаружено, что локус E2, отвечающий за скорость созревания, обладает плейотропным эффектом и одновременно контролирует продуктивность и качество семян [32]. Контроль продуктивности также полигенный: в исследованиях по полногеномному поиску ассоциаций выявлены до 30 значимо ассоциированных ОНП, локализованных на 12 из 20 хромосом сои [33–35], некоторые из них воспроизводятся в разных условиях выращивания.

Не менее 110 QTL для содержания соевого масла были нанесены на карту, но использование

этих QTL для селекции сои имеет некоторые ограничения [3]. Продемонстрирована стабильность в разных условиях выращивания QTL qOil-5-1, qOil-10-1 и qOil-14-1 [36]. Недавно авторы работы [37] провели сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей между линиями с высоким и низким содержанием масла и выявили различие в ОНП и количестве копий генов, контролирующих биосинтез и деградацию липидов у этих линий. Сравнительный анализ показывает увеличенное количество копий гена белка транспорта липидов (LPT; *Glyma.16g31780*, *Glyma.16g31840* и *Glyma.16g31540*) в линиях с высоким содержанием масла и большее число копий генов негативных регуляторов биосинтеза липидов (ABC-транспортер, *Glyma.03g36310*, *Lipase3*, и *Glyma.13g04561*) в линиях с низким содержанием масла. Возможно, это различие в числе копий генов обуславливает различие между линиями.

Наши результаты добавляют новое измерение в эти исследования благодаря включению в анализ сортов культурной сои, используемых в отечественной селекции, и позволяет выделить ассоциации с геномными областями, не обнаруженными в предыдущих анализах GWAS и QTL. Идентифицированные нами районы картируются в непосредственной близости от генов, участвующих в транспорте веществ через мембраны в клубеньках, синтезе белка и транспорте аминокислот, синтезе и деградации липидов в семенах, фоторепарации, реакции на стресс, а также генов, обеспечивающих специфичность слияния везикул при везикулярном транспорте. Некоторые из идентифицированных нами ОНП близки к уже известным ОНП, например ОНП Gm04:37264793, положительно влияющий на содержание масла в семенах и отрицательно – на содержание белка, локализуется на расстоянии 69 т.п.н. от ранее идентифицированного ОНП, ассоциированного с содержанием белка [38]. Ассоциированный с содержанием масла в семенах ОНП Gm19:45429114 локализован в районе длиной около 85 т.п.н., в котором находятся три ОНП, ассоциированных с продуктивностью [39] и числом семян [32]. Gm14:42540153, ассоциированный с содержанием масла в семенах, локализуется в районе длиной порядка 100 т.п.н., в котором идентифицированы четыре ОНП, ассоциированных с сухим весом 100 семян [40]. ОНП Gm06:51013713, Gm14:34210754 и Gm17:15598101, ассоциированные с продуктивностью, находятся соответственно на расстоянии 58 т.п.н., 45 т.п.н. и 56 т.п.н. от известных ОНП, ассоциированных с различными признаками, характеризующими урожайность (число семян в бобе, вес семян и сухой вес 100 семян соответственно) [32, 40, 41]. Наконец, ОНП Gm13:32199622, ассоциированный с содержанием белка, находится на расстоянии

26 т.п.н. от известного ОНП, ассоциированного с весом семян [39].

Результаты, полученные в этой статье, будут использованы для создания молекулярных маркеров с целью ускорения селекции сои и получения новых сортов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления были проведены в Суперкомпьютерном центре «Политехнический» СПбПУ и кластере Университета Южной Калифорнии. Исходные данные получены на базе уникальной научной установки Коллекция генетических ресурсов растений ВИР.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках и при финансовой поддержке Федеральной целевой программы (проект №14.575.21.0136 от 26.09.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0136).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. V. Heim and J. D. Gillman, *G3: Genes, Genomes, Genetics* **7** (1), 299 (2017).
2. N. B. Bandillo, A. J. Lorenz, G. L. Graef, et al., *Plant Genome* **10** (2), 1 (2017). doi: 10.3835/plantgenome2016.06.0054
3. G. Kumawat, S. Gupta, M. B. Ratnaparkhe, et al., *Front Plant Sci.* **7**, 1852 (2016). doi: 10.3389/fpls.2016.01852
4. E.-U. Hwang, Q. Song, G. Jia, et al., *BMC Genomics* **15**, 1 (2014).
5. C. van Warrington, H. Abdel-Haleem, J. H. Orf, et al., *Crop Sci.* **54**, 963 (2014).
6. Sh. Chen, T. Huang, Y. Zhou, et al., *BMC Bioinformatics* **18**, 80 (2017).
7. B. Langmead and S. L. Salzberg, *Nature Methods* **9** (4), 357 (2012). doi: 10.1038/nmeth.1923.
8. D. Tello, J. Gil, C. D. Loaiza, et al., *Bioinformatics*, **35** (22), 4716 (2019). doi: 10.1093/bioinformatics/btz275
9. P. Danecsek, A. Auton, G. Abecasis, et al., *Bioinformatics* **27**, 2156 (2011).
10. S. S. Shapiro and M. B. Wilk, *Biometrika* **52** (3–4), 591 (1965). doi: 10.1093/biomet/52.3-4.591
11. F. E. Harrell, Jr, *Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.1-1*. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>.
12. *The R Project for Statistical Computing*. URL: <https://www.R-project.org/>.
13. W. G. Hill and B. S. Weir, *Theor. Popul. Biol.* **33**, 54 (1988).
14. X. Zheng, D. Levine, J. Shen, et al., *Bioinformatics* **28** (24), 3326 (2012).
15. D. Falush, M. Stephens, and J. K. Mol. Ecol. Notes **7**, 574 (2007).
16. Ch. C. Chang, C. C. Chow, L. C. Tellier, et al., *GigaScience* **4**, 1 (2015).
17. J. D. Storey, *Ann. Stat.* **31**, 2013 (2003).
18. S. Dash, J. D. Campbell, E. K. Cannon, et al., *Nucl. Acids Res.* **44**, D1181 (2016).
19. D. P. S. Verma, M. G. Fortin, J. Stanley, et al., *Plant Mol. Biol.* **7**, 51 (1986).
20. E. M. Quistgaard, C. Löw, F. Guettou, and P. Nordlund, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **17** (2), 123 (2016). DOI: 10.1038/nrm.2015.25
21. L. Yu, X. Tan, B. Jiang, Sun X, Gu S, Han T, et al., *PLoS One* **9** (7), e100144 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0100144
22. T. R. Larson, T. Edgell, J. Byrne, et al., *Plant J.* **32** (4), 519 (2002). DOI: 10.1046/j.1365-313x.2002.01440.x
23. N. Li, Ch. Xu, Y. Li-Beisson, and K. Philippar, *Trends Plant Sci.* **21** (2), 145 (2016). DOI: 10.1016/j.tplants.2015.10.011
24. S. S. Gill, N. A. Anjum, R. Gill, et al., *Sci. World J.* **2015**, 250158 (2015). DOI: 10.1155/2015/250158
25. C. Chen, X. Sun, H. Duanmu, et al., *PLoS One* **10** (11), e0141888 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0141888
26. F. Y. H. Teng, Y. Wang, and B. L. Tang, *Genome Biol.* **2**, reviews3012.1 (2001). DOI: 10.1186/gb-2001-2-11-reviews3012
27. W.-N. Fischer, D. D. F. Loo, et al., *Plant J.* **29** (6), 717 (2002).
28. H. Yang, Y.-D. Stierhof, and U. Ludewig, *Front. Plant Sci.* **6**, 212 (2015). DOI: 10.3389/fpls.2015.00212
29. J. Wang, P. Chen, D. Wang, et al., *Mol. Breeding* **35**, 92 (2015). DOI: 10.1007/s11032-015-0285-6
30. C. V. Warrington, H. Abdel-Haleem, D. L. Hyten, et al., *Theor. Appl. Genet.* **128** (5), 839 (2015). DOI: 10.1007/s00122-015-2474-4
31. H. Sonah, L. O'Donoghue, E. Cober, et al., *Plant Biotechnol. J.* **13** (2), 211 (2015). DOI: 10.1111/pbi.12249
32. C. Fang, Y. Ma, S. Wu, et al., *Genome Biol.* **18**, 161 (2017). doi: 10.1186/s13059-017-1289-9
33. B. W. Diers, J. Specht, K. M. Rainey, et al., *G3: Genes, Genomes, Genetics* **8** (10), 3367 (2018). DOI: 10.1534/g3.118.200332

34. A. Xavier, D. Jarquin, R. Howard, et al., *G3: Genes, Genomes, Genetics* **8** (2), 519 (2018). DOI: 10.1534/g3.117.300300
35. Ya. Jing, et al., *Front. Plant Sci.* **9**, 1392 (2018). DOI: 10.3389/fpls.2018.01392
36. Y. Cao, S. Li, Z. Wang, et al., *Front. Plant Sci.* **8**, 1222 (2017). DOI: 10.3389/fpls.2017.01222
37. B. Valliyodan, Dan Qiu, G. Patil, et al., *Sci. Rep.* **6**, 23598 (2016). DOI: 10.1038/srep23598
38. Y. Han, X. Zhao, D. Liu, et al., *New Phytol.* **209** (2), 871 (2016). DOI: 10.1111/nph.13626
39. R. I. Contreras-Soto, F. Mora, F. Lazzari, et al., *Breed Sci.* **67** (5), 435 (2017). DOI: 10.1270/jsbbs.17024
40. X. Li, X. Zhang, L. Zhu, et al., *BMC Genetics* **20** (1), 39 (2019). DOI: 10.1186/s12863-019-0737-9
41. Q. Song, D. L. Hyten, G. Jia, et al., *G3: Genes, Genomes, Genetics* **5** (10), 1999 (2015). DOI: 10.1534/g3.115.019000.

Genetic Variants Associated with Productivity and Protein and Oil Content in Soybeans

A.A. Kanapin* **, A.B. Sokolkova*, A.A. Samsonova* **, A.V. Schegolkov*, S.V. Boldyrev****, A.F. Aupova****, P.E. Khaitovich****, S.V. Nuzhdin*****, and M.G. Samsonova***

*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

**St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

***The "SOKO" Company, ul. Filatova 19/2, Krasnodar, 350038 Russia

****Skolkovo Institute of Science and Technology, ul. Nobelya 3, Moscow, 143026 Russia

*****University of Southern California, CA 90089, Los Angeles, USA

Biodiversity-based approaches are at the forefront of creating new varieties in soybean production. This paper presents an analysis of natural variability in the population of cultivated soybean varieties used in breeding in Russian Federation which was performed using Genome-Wide Association Studies. Genome regions controlling the protein and oil content in seeds as well as productivity have been identified, many of which have not been described previously. The obtained results open the way to the creation of new markers for marker selection of this crop.

Keywords: soybean, Genome-Wide Association Studies, productivity, protein and oil content in seeds

ТЕЧЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ КОНВЕЙЕР: ВЛИЯНИЕ НА ФОТОСИНТЕЗ И ПОТОКИ H^+ В КЛЕТКАХ *Chara*

© 2020 г. А.А. Булычев, А.В. Алова, Н.А. Крупенина, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы 1/12

E-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 21.01.2020 г.

Клеткам гигантских размеров, таким как междуузлия харовых водорослей, свойственно быстрое (до 100 мкм/с) круговое течение цитоплазмы, которое участвует в дальних внутриклеточных взаимодействиях и координирует функциональную активность органелл в условиях неоднородного освещения. Конкретные функции интенсивного движения цитоплазмы остаются малоизученными. Сочетание локального освещения с измерением флуоресценции хлорофилла и внеклеточного рН на микроучастках клетки, расположенных ниже по течению цитоплазмы, представляет удобный инструмент для выявления латерального транспорта фотометаболитов и циклоз-зависимой регуляции плазмалеммного транспорта H^+ и фотосинтеза хлоропластов. В зоне интенсивного освещения хлоропласты экспортируют в поток восстановительные эквиваленты и триозофосфаты, которые распределяются по клетке и вызывают переходное возрастание флуоресценции хлорофилла в слабоосвещенных участках клетки вдали от места приложения фотостимула. Рассмотрены свойства опосредованных циклозом изменений флуоресценции, включая фотоиндукцию дальних взаимодействий, чувствительность к ингибиторам метаболизма, неоднородное пространственное распределение в освещенных клетках, а также постепенную (1–5 мин) инактивацию дистанционной передачи сигналов после помещения клетки в темноту. Показано стимулирующее влияние потенциала действия на дальнюю передачу сигналов. Обсуждается применение нового метода для изучения межклеточного транспорта метаболитов и анализа проницаемости плазмодесм.

Ключевые слова: течение цитоплазмы, дальняя сигнализация, неоднородные профили рН, дистанционная регуляция активности фотосистемы II, плазмодесмы.

DOI: 10.31857/S0006302920020106

Термин «внутриклеточный конвейер» нечасто встречается в публикациях по биофизике и биохимии клетки. Упоминание о конвейере напоминает о производственной непрерывно движущейся ленте с поступающими заготовками, которые подвергаются обработке по мере их продвижения от исходной позиции до места назначения. В клетках растений аналогичную роль выполняет движение цитоплазмы. Течение цитоплазмы известно уже почти 250 лет: впервые его описал итальянский физик Bonaventura Corti в 1774 г., разглядывая под микроскопом клетки водоросли *Chara*. За последние полвека достигнуты большие успехи в понимании механизма движения цитоплазмы [1, 2]. Значительно меньше известно о функциональной роли внутриклеточных потоков жидкости. Исходя из общих представлений,

предполагаемая функция течения цитоплазмы состоит в выравнивании внутриклеточных концентрационных градиентов [3, 4]. Поток распределяет вещества по клетке, доставляя их к межклеточным барьерам, что способствует перемещению сигнальных соединений и ассимилятов на дальние расстояния и в зоны активного роста. Конкретные примеры участия потока жидкости в клеточных процессах в настоящее время остаются единичными.

Дальний транспорт — один из важнейших процессов в растениях — всегда включает внутриклеточную и трансклеточную стадии, которые состоят в переносе вещества по цитоплазме и его прохождении через межклеточные контакты — плазмодесмы [4]. Для изучения транспорта веществ от клетки к клетке часто использовали микроинъекцию флуоресцентных красителей, таких как карбоксифлуоресцеин [5, 6]. Однако этот метод инвазивен, не обеспечивает точной

Сокращения: QA — первичный хинонный акцептор фотосистемы II, ФС II — фотосистема II, ФС I — фотосистема I.

локализации вводимого зонда в цитоплазму или вакуоль, а также нарушает клеточный состав и внутреннее давление в клетке, что осложняет однозначную интерпретацию получаемых результатов. В этой связи важную роль приобретает поиск неповреждающих методов и адекватных модельных объектов. Харовые водоросли филогенетически относятся к ближайшим родственникам высших растений [7] и представляют одну из наиболее удобных моделей растительной клетки.

Побеги водоросли *Chara* состоят из чередующихся гигантских интернодальных клеток и мелких узловых клеток. Крупные размеры междоузлий определяют наличие у них особых, во многом уникальных свойств. Эти клетки электрически возбудимы; на них были впервые выявлены потенциалозависимые и Ca^{2+} -управляемые ионные каналы плазмалеммы и тонопласта [8, 9]. На свету клетки хары проявляют способность к самоорганизации — образуют неоднородные продольные профили pH и фотосинтеза [10–15]. Они обладают исключительно быстрым (до 100 мкм/с) течением цитоплазмы [16, 17]. Им свойственна биогенная кальцификация, т.е. связанное с метаболизмом осаждение на клеточных стенках кристаллов кальция в зонах с высоким pH [18]. Эти клетки способны залечивать мелкие повреждения, что позволяет избежать больших потерь биомассы при гибели отдельной клетки [19, 20]. Цепочки клеток удобны также для изучения межклеточных контактов. Они идеально подходят для микрофлуориметрических измерений флуоресценции хлорофилла, поскольку хлоропласты неподвижны и расположены в один слой по периферии клеток.

Гигантские (до 10 см) размеры клеток *Chara corallina* и *C. australis* (до 20 см у *Nitellopsis*) диктуют необходимость особых механизмов передачи сигналов. В клетках малых размеров реагенты смешиваются за время менее 1 с, но для диффузии на расстояние 5 см потребовалось бы несколько недель. Очевидно, что харовые водоросли располагают другими средствами регуляции и координации клеточных процессов.

Быстрая передача сигналов может осуществляться за счет проведения электрических импульсов — потенциалов действия [21]. При скорости распространения потенциала действия около 1 см/с, электрический сигнал (кратковременная деполяризация длительностью ~2 с) и связанное с ним почти стократное повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме проходят волной по клетке за время менее 10 с. Однако потенциалы действия возникают лишь в неблагоприятных условиях (механическое воздействие, утечка электролитов из поврежденных клеток), но обычно отсутствуют у клеток в состоянии покоя. Основной путь передачи сигналов и метаболитов в физиологически

нормальных условиях — их перенос с потоком цитоплазмы. При толщине текущего слоя около 5 мкм и диаметре клетки 0.7 мм, через сечение цитоплазмы проходит объем ~1 нл/с. Хлоропласты лежат тесными рядами по периферии клетки на границе между подвижной эндоплазмой и неподвижным слоем эктоплазмы. К внутренней стороне слоя хлоропластов прикреплены актиновые филаменты, по которым, как направляющим, происходит АТФ-зависимое движение молекул миозина, нагруженных везикулами [20]. Везикулы увлекают за собой прилегающие слои воды, что создает круговое течение жидкости. Максимальная скорость движения достигается на границе между неподвижными хлоропластами и текущей эндоплазмой [3, 22]. Движение по замкнутому циклу называют ротационным. Встречные потоки разделены прозрачной нейтральной полосой. В этой полосе слой цитоплазмы сужается, не оставляя места для размещения пластид. Поток жидкости направлен по слабо закрученной спиральной траектории. Скорость течения сильно зависит от температуры и в меньшей степени от других физических факторов. Потенциал действия вызывает временную (на 30 с) остановку движения и медленное (5–10 мин) восстановление скорости течения до исходного уровня.

Распределение веществ по клетке с потоком жидкости имеет очевидный смысл лишь при условии неоднородного состава цитоплазмы. Такая ситуация возникает, например, при неравномерном освещении, когда яркий свет попадает на часть клетки, а другие части находятся в тени. Перенос избыточного количества продуктов световых реакций из зоны насыщающего освещения к хлоропластам, лежащим в зоне затенения, у которых возможности фиксации CO_2 использованы не в полную меру из-за нехватки этих продуктов, может внести прибавку в общий фотосинтез. Для эффективного внутриклеточного распределения фотометаболитов необходимо не только интенсивное течение цитоплазмы, но и наличие быстрого обмена между хлоропластами и цитоплазмой. Главные транспортные системы оболочки пластид — это так называемый «малатный клапан» и транслокатор триозофосфатов [23, 24]. Обе системы выполняют функцию переноса восстановительных эквивалентов (redox shuttles): они выводят NAD(P)H из освещенных хлоропластов, поскольку при линейном фотосинтетическом потоке электронов NADPH образуется в избытке по сравнению с АТФ. Оба переносчика светозависимы и теряют активность в темноте [24].

Влияние течения цитоплазмы на клеточные процессы можно изучать, подводя к клетке по оптоволокну узкий луч (диаметром 0.4 мм) и наблюдая за проявлениями фотостимуляции по изменениям флуоресценции хлорофилла и pH у

поверхности клетки на удалении 1–6 мм от места локального освещения [25, 26]. Флуоресценцию хлорофилла возбуждают слабым модулированным светом (метод импульсно модулированной флуорометрии, РАМ), который не влияет на состояние хлоропластов. Кроме того, всю клетку помещают на слабый фоновый свет (~ 10 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), который поддерживает фотосинтетический аппарат в активном состоянии. Измерения рН в перемешиваемом слое наружной среды позволяют судить о направлении и величине потоков H^+ через микроучастки плазматической мембраны.

Локальное освещение индуцирует экспорт метаболитов из стромы хлоропластов в цитоплазму, которая перемещается с максимальной скоростью на границе со стационарным слоем хлоропластов. Экспортируемые метаболиты движутся латерально в виде пакета, размер которого определяется длительностью освещения и скоростью течения цитоплазмы. Время нахождения метаболитов в пути, пока они не достигли анализируемого участка, определяет длительность лаг фазы ответных реакций флуоресценции и рН. Когда же метаболиты поступают в зону измерения, они вызывают переходные изменения обоих параметров. Эти изменения отражают дистанционное опосредованное циклозом регуляторное действие света на хлоропласты и плазматическую мембрану [27].

Первые результаты опытов с пространственным разделением зоны фотостимуляции и места наблюдения функциональных изменений опубликованы в ряде экспериментальных и обзорных статей [28–33]. В настоящей работе подытожены главным образом более поздние исследования, не отраженные в обзорах [31, 32].

При измерениях рН в слабощелочной области у поверхности клетки установлено, что локальное освещение соседних областей, лежащих выше в потоке цитоплазмы, приводит в течение 3–4 мин к образованию сильнощелочной зоны, с перепадом рН до 2 единиц между исходным и конечным значениями. При подведении луча на таком же удалении от места измерения, но ниже по течению цитоплазмы, образования щелочной зоны в том же участке клетки не происходило. Результаты говорят о том, что на свету хлоропласты высвобождают продукт, который переносится с потоком цитоплазмы и индуцирует образование наружной щелочной зоны [34]. Таким образом, генерация неоднородного профиля рН в интернодальных клетках при освещении тесно связана с движением метаболитов в потоке цитоплазмы.

В аналогичных опытах с короткими (30 с) экспозициями локального освещения измеряли сдвиги рН отдельно в щелочных и кислых зонах. При освещении участка клетки, расположенного

выше по течению цитоплазмы от места измерения, рН в щелочной зоне возрастал на ~ 0.05 рН, а в кислой — снижался. Время $t_{1/2}$ от начала локального светового импульса до половинного сдвига рН линейно зависело от расстояния d между источником света и местом измерения. Графики времени $t_{1/2}$ от расстояния для щелочной и кислой зон имели равный наклон (угловой коэффициент 17.4 ± 2 с/мм), однако время $t_{1/2}$ для кислой зоны было примерно на 15 с короче, чем для щелочной зоны, причем это различие сохранялось при варьировании расстояния d от 1 до 3 мм. Повидимому, существуют два разных интермедиата, один из которых попадает в цитоплазму раньше, чем другой. «Быстрый» интермедиат отвечает в первую очередь за активацию H^+ -насоса плазмалеммы, а «задержанный» — за повышение пассивной H^+ -проводимости. Судя по равному наклону линейных зависимостей $t_{1/2}$ от расстояния d , в потоке цитоплазмы оба интермедиата перемещаются с равной скоростью (около 60 мкм/с).

Метаболиты, экспортируемые хлоропластами на свету, воздействуют не только на плазмалемму, но и на хлоропласты, расположенные ниже по течению от зоны освещения. Это проявляется в переходном возрастании флуоресценции хлорофилла примерно на 25% после латентного периода от 20 до 30 с [35]. Возрастание флуоресценции говорит о том, что метаболиты, экспортируемые освещенными хлоропластами, достигают затененных областей, поступают в строму пластид и вызывают временное восстановление пула пластохинонов, включая первичный хинонный акцептор (Q_A), состояние которого определяет уровень свечения фотосистемы II (ФС II). Пик флуоресценции достигается примерно в то же время, когда происходят сдвиги рН. Однако графики достижения пика F' в зависимости от расстояния до источника света для щелочных и кислых зон совпадали, в отличие от сдвига аналогичных графиков для изменений рН. Следует отметить, что при повышенных интенсивностях светового фона локальное освещение индуцирует тушение флуоресценции, которое развивается вслед за начальной стадией возрастания свечения [25].

Применение ингибитора полимеризации актина (цитохалазина D), который полностью останавливает течение цитоплазмы [36], позволяет убедиться в микрофлюидной передаче сигнала-регулятора флуоресценции. Остановка движения сопровождается полным исчезновением изменений флуоресценции в ответ на локальное освещение удаленного участка клетки [37, 38], а отмывание клетки свежей средой и восстановление течения возобновляют ответную реакцию на локальный фотостимул. При промежуточных скоростях течения пик флуоресценции появляется с задержкой на десятки секунд, становится ши-

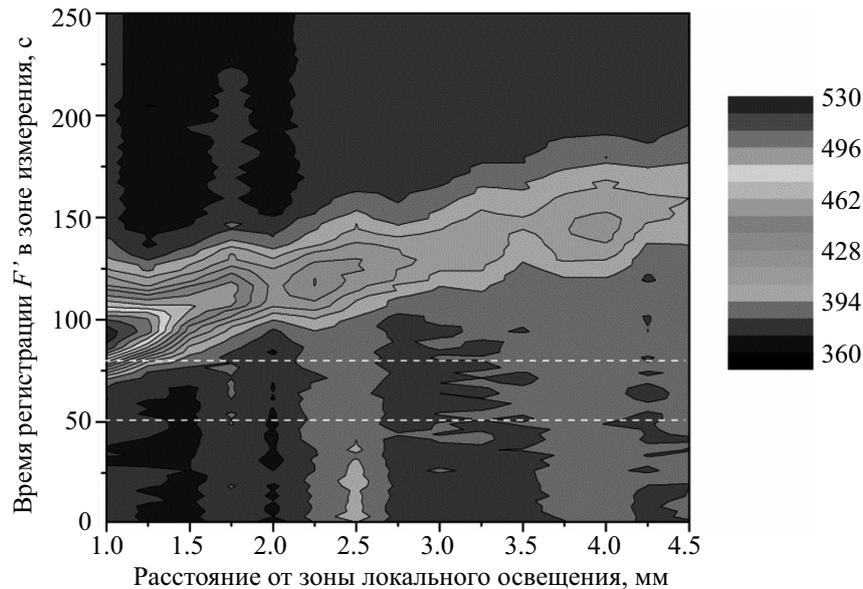


Рис. 1. Диаграмма изменений флуоресценции хлорофилла F' при разных расстояниях от области локального освещения до зоны измерения. Поток цитоплазмы направлен от места подведения световода к флуориметрируемому участку. Градации окраски соответствуют разной интенсивности флуоресценции. Горизонтальные штриховые линии отмечают моменты включения и выключения локального освещения (при $t = 50$ и 80 с от начала регистрации F' соответственно).

ре и меньше по амплитуде. Уширение имеет диффузионную природу: чем дальше по времени движется пакет метаболитов до поступления в зону анализа, тем сильнее сказывается диффузия на ширине пакета и форме изменений F' в ответ на действие локального освещения. При учете поступательного движения пакета метаболитов, их диффузии в процессе транслокации и частичного потребления метаболитов в ходе их продольного перемещения по клетке, удастся получить качественное соответствие экспериментальных данных и кинетических кривых изменений F' , рассчитанных на основе математической модели [27]. Модель описывала ход изменений F' как при равномерном поступательном движении цитоплазмы, так и в случае переменной скорости течения — при возобновлении цикла после его временной остановки под влиянием потенциала действия.

Аналогичные модификации сигнала флуоресценции F' проявляются и при постоянной скорости течения, если увеличивать расстояние между источником локального света и областью измерения [38]. При коротких разделяющих расстояниях (1.0–1.5 мм) пик F' достигается сравнительно быстро и имеет большую амплитуду. На больших расстояниях ($d = 3.0$ –4.5 мм) пик развивается после длительной задержки, а ширина полосы изменений F' возрастает. Зависимость расположения пика F' от расстояния можно представить диаграммой, показанной на рис. 1. Чем дальше отведен световод от зоны измерения, тем больше про-

ходит времени от момента включения локального света до достижения пика флуоресценции. Прямая, проведенная по пиковым значениям F' на этой диаграмме, позволяет рассчитать скорость движения метаболита, вызывающего дистанционные изменения флуоресценции. В данном случае при увеличении длины пути на 3.5 мм пик F' сместился на 65 с. Скорость распространения регуляторного фактора составила 54 мкм/с. Это примерно на треть меньше, чем скорость, измеряемая по движению частиц в проходящем свете микроскопа. Небольшое замедление переноса, возможно, связано с тем, что в процессе движения метаболит многократно и обратимо связывается с малоподвижными внутриклеточными структурами [39].

Главные стадии дальнейшей передачи метаболического сигнала различаются по локализации и выполняемым функциям: (1) образование и экспорт фотометаболитов в ярко освещаемом участке клетки, (2) перенос экспортируемых субстратов с потоком цитоплазмы на расстояния до 5–6 мм, (3) импорт триозофосфатов и восстановительных эквивалентов из потока жидкости в строму затененных хлоропластов и (4) биохимические и редокс-реакции, ведущие к восстановлению пластохинона и хинонного акцептора ФС II, что связано с появлением пика флуоресценции. После ухода метаболита из области измерения уровень F' , отражающий состояние хлоропластов, возвращается к норме, иногда с немонотонной кинетикой. Флуоресценция опускается на 2–3 мин чуть

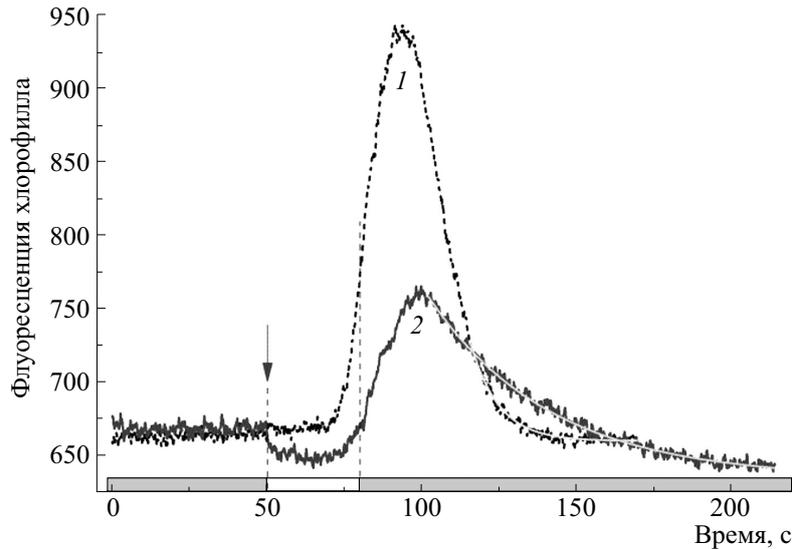


Рис. 2. Опосредованные циклозом ответы флуоресценции F' на локальное освещение участка, лежащего вдали от места регистрации F' , в условиях фоновой подсветки ($14 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, кривая 1) и при выключении фонового освещения одновременно с приложением локального светового импульса (кривая 2). Стрелка относится только к записи 2 и отмечает момент выключения фоновой подсветки. Кривые 1 и 2 — усредненные записи, полученные на пяти клетках.

ниже исходного уровня, а квантовый выход фото-реакции ФС II повышается. Одна из возможных причин такого пережеста в изменениях F' — усиленный отток электронов из пула пластохинона вследствие восстановительной активации ферментов фиксации CO_2 и повышенного потребления NADPH [39].

Для понимания роли и особенностей отдельных этапов микрофлюидной сигнализации важно выбрать избирательные воздействия на перечисленные стадии. Например, действие цитохалазина D на актиновые филаменты селективно подавляет стадию латерального транспорта метаболитов. К сожалению, во многих случаях невозможно разделить действие ингибиторов метаболизма на начальные и конечные стадии преобразования сигнала. В частности, передача сигнала необратимо подавляется при действии дифенилениодонима и метилвиологена [35]. Оба реагента нарушают перенос электронов на участке за фотосистемой I (ФС I). Известно, что дифенилениодоним подавляет ферредоксин-NADP редуктазу и флавиновые ферменты. Под действием метилвиологена CO_2 -зависимый фотосинтетический поток электронов переключается на восстановление O_2 . В покоящихся клетках *Chara* этот гербицид не проникает к мишеням своего действия даже после длительной (30 мин) инкубации. Однако его эффект проявляется мгновенно после однократной генерации потенциала действия [15, 40]. По-видимому, двухвалентно заряженный катион метилвиологена проникает в клетку по потенци-

ал-зависимым каналам, пропускающим Ca^{2+} и другие двухвалентные катионы. Результаты опытов с ингибиторами подчеркивают роль реакций, протекающих на акцепторной стороне ФС I и в стромах хлоропластов. Однако остается неясным, нарушает ли действие дифенилениодонима и метилвиологена образование и экспорт метаболитов (стадия 1), или же и реакции на терминальном участке сигнальной цепи (стадии 3, 4).

Известно, что обмен метаболитов между стромой хлоропластов и цитозолем зависит от света [41]. Опыты, направленные на темновую инактивацию и фотоактивацию ферментов, выявили сильную зависимость дальнейшей передачи сигналов от световых условий [26, 35]. На рис. 2 показаны переходные изменения флуоресценции F' после локального освещения клетки на слабом фоновом свете и в условиях, когда фоновый свет был выключен синхронно с началом импульса локального освещения. Ферменты инактивируются в минутном интервале, поэтому выключение фонового света одновременно с включением локального света прекращает световые реакции в области наблюдения, но не нарушает ферментативные процессы. При затемнении клетки амплитуда изменений флуоресценции снижается в два-три раза, а релаксация сигнала замедляется. Замедление спада изменений F' после переходного пика у помещенных в темноту клеток, очевидно, обусловлено прекращением фотохимической активности хлоропластов в области наблюдения. На свету ФС I окисляет пул пластохинонов, что обеспечивает сравнительно быстрое снижение F'

после прохождения пика, но в темноте ФС I неактивна и не участвует в окислении пластохинона/ Q_A . В этом случае окисление пластохинона/ Q_A происходит за счет альтернативных путей, например, при участии пластидной терминальной оксидазы.

Причина ослабления ответной реакции на локальный свет при переносе клетки в темноту не вполне ясна. С одной стороны, более сильные ответные изменения F' при фоновом освещении могут указывать на преобладание фотохимического (ФС II-зависимого) восстановления пластохинона/ Q_A в сравнении с нефотохимическим (темновой поток электронов от NADPH на пластохинон при участии антимицин-чувствительного сегмента циклической цепи [26]). Однако отдельные наблюдения не укладываются в это объяснение. В ряде случаев ответная реакция F' на локальный луч в отсутствие фонового освещения оказывается более сильной, чем на фоновом свету. Не исключено, что ослабление реакции на локальный свет, наблюдаемое после выключения светового фона, связано с возрастанием потерь транспортируемого метаболита по мере его продвижения с потоком. В начальный период затемнения цикл фиксации CO_2 и транслокаторы оболочки сохраняют активность, тогда как внутренние ресурсы NADPH не пополняются вследствие остановки фотореакций после переноса клетки в темноту. Дальнейшие исследования должны прояснить вопрос о том, в каких пределах меняется содержание транспортируемых метаболитов в цитоплазме при изменении световых условий.

Предварительное выключение фонового света постепенно ослабляло ответную реакцию на локальный световой импульс [26]. После двухминутной темноты амплитуда изменений была вдвое меньше, чем при выключении фона в момент начала локального светового импульса, а после 4.5-минутной темновой адаптации реакция на локальное освещение полностью исчезала. Эти изменения, вероятно, отражают инактивацию транслокаторов оболочки в области измерения флуоресценции. Тот факт, что трансмиссивное состояние сохраняется в темноте на протяжении нескольких минут, означает, что возрастание флуоресценции связано с темновым (нефотохимическим) потоком электронов от поступивших в строму восстановителей в пул пластохинонов и восстановлением хинонного акцептора Q_A .

При обратном переходе от темноты к фоновому освещению реакция флуоресценции на локальный фотостимул у адаптированных к темноте клеток поначалу отсутствует. После трехминутной слабой подсветки ответная реакция на локальное освещение удаленного участка полностью восстанавливалась [35]. Явление фотоиндукции дальнейшей передачи сигнала аналогично

фотоиндукции фиксации CO_2 . Как известно, индукция ассимиляции CO_2 отражает переход ферментов цикла Кальвина в активное состояние на свету при участии восстановленного тиоредоксина, получающего электроны от ФС I. Переход в трансмиссивное состояние у клеток хары, по-видимому, включает фотоактивацию транслокаторов оболочки.

Микрофлюидную сигнализацию изучали преимущественно на слабом свету, при котором измеряемые свойства клетки (флуоресценция, квантовый выход фотореакции ФС II, локальные значения pH на поверхности) распределены равномерно по ее длине. Если же клетка приобретает неоднородные свойства после экспозиции на ярком свету (чередующиеся щелочные и кислые зоны), то способность к дистанционной регуляции ФС II и флуоресценции хлорофилла становится также неоднородной по длине междоузлия. Опыты показали, что дистанционная регуляция флуоресценции хорошо выражена в кислых зонах и сильно ослаблена в щелочных зонах [26, 42]. При этом сдвиги pH в щелочных зонах в ответ на локальное освещение сохранялись, т.е. перенос метаболитов в потоке не был нарушен.

Разную эффективность передачи сигнала в щелочных и кислых зонах можно попытаться объяснить на основе так называемой CO_2 -гипотезы. Исходное положение состоит в том, что в кислой области повышено содержание углекислоты. Поэтому локальное освещение вызывает обильное производство и экспорт триозофосфатов, что и приводит к большим сдвигам флуоресценции F' на терминальном участке сигнальной цепи. Напротив, в щелочных зонах углекислота отсутствует; бикарбонат и карбонат ионы в клетку не проникают из-за наличия у них заряда; поэтому из-за нехватки субстрата цикла Кальвина–Бенсона нет производства и экспорта триозофосфатов.

Для оценки этой возможности мы измеряли переходные изменения флуоресценции хлорофилла в ответ на локальное освещение в зонах с разным наружным pH. График амплитуды изменений флуоресценции от pH в примембранных слоях имеет сигмоидный вид со значением pK около 9.3, тогда как pK для равновесия CO_2 – HCO_3^- составляет 6.3 [43]. Этот результат явно не укладывается в CO_2 -гипотезу. По-видимому, для передачи сигнала важна не концентрация CO_2 , а величина pH цитоплазмы, влияющая на транслокаторы оболочки и ферменты стромы. Трансмембранный поток протонов по-разному сдвигает pH на противоположных сторонах мембраны. Уместно привести хорошо известную аналогию: фотоиндуцированный перенос H^+ через тилакоидную мембрану приводит к противоположным сдвигам pH в тилакоиде и в строме. Сдвиги pH разного

знака происходят и на разных сторонах у поверхности бислоидной липидной мембраны при переносе через нее протонов в присутствии ионофоров или слабых оснований [44]. Точно так же перенос H^+ из цитоплазмы в наружный раствор через плазматическую мембрану вызывает не только закисление среды, но и повышение рН цитоплазмы. Соответственно, входящий в клетку поток H^+ вызывает щелочной сдвиг рН снаружи и должен закислять цитоплазму. Именно такое влияние потоков H^+ на рН цитоплазмы выявлено в растущих пыльцевых трубках лилии [45]. В зоне АТФ-зависимого выведения протонов на небольшом удалении от растущего кончика рН цитоплазмы был почти на 1 ед. выше, чем в области пассивного поступления H^+ (в апексе). Можно предполагать, что аналогичная закономерность соблюдается и в случае харовых водорослей.

Для проверки представлений о пониженном рН цитоплазмы как причине сильного подавления циклоз-зависимой передачи сигнала в области наружных щелочных зон можно использовать ряд воздействий. Одно из них состоит в возбуждении плазматической мембраны: генерация потенциала действия вызывает длительную остановку входящего потока H^+ и сильно ослабляет щелочные зоны [46–49]. После возбуждения рН у поверхности резко понижается, а остановка входящего потока H^+ должна вызывать щелочной сдвиг рН цитоплазмы. При этом амплитуда изменений флуоресценции в ответ на локальное освещение удаленного участка возрастала в пять-шесть раз [43]. Второй прием основан на подавлении входящего потока H^+ в области щелочных зон в присутствии NH_4^+ . Ионы аммония повышают рН цитоплазмы благодаря проникновению нейтральных молекул аммиака через плазматическую мембрану и последующему связыванию протонов в цитозоле. Значение pK для равновесия NH_3/NH_4^+ составляет 9.25. Высокий рН в щелочных зонах определяет повышенное содержание нейтральной депротонированной формы (NH_3), что способствует быстрому проникновению этой формы в цитозоль. На внешней стороне рН смещается при этом в кислую сторону. В присутствии NH_4^+ , так же как и после потенциала действия, изменения флуоресценции в ответ на локальное освещение в исходно щелочной зоне возрастали примерно в десятикратном размере [43]. Это подтверждает гипотезу о закислении цитоплазмы под щелочными зонами у освещенных клеток в физиологических условиях. В таком случае нарушения дальних межхлоропластных коммуникаций под наружными щелочными зонами связаны с понижением рН цитоплазмы в этих

участках клетки вследствие интенсивного входящего потока протонов.

Для дополнительной проверки CO_2 -гипотезы мы выясняли, насколько важна величина рН той области клетки, куда направлен локальный свет. Зная продольный профиль рН, можно расположить световод и область измерения в точках с известными значениями рН. Были выбраны четыре конфигурации измерений, условно названные по движению потока (1) из кислой зоны в кислую, (2) из кислой в щелочную, (3) из щелочной в щелочную и (4) из щелочной в кислую [26]. Если решающим фактором служит образование триозофосфатов за счет наличия CO_2 в наружных кислых зонах, то в конфигурациях (1) и (2) можно ожидать изменения F' одинаково большой амплитуды. Результаты получились качественно иными. Оказалось, не так важно, в щелочную или кислую область клетки был направлен локальный свет, а важен рН той области, где проводятся измерения. В конфигурациях 1 и 4 изменения F' были большими и примерно равными. А в конфигурациях 2 и 3 изменения были слабыми. Следовательно, причина различий состоит не в том, что хлоропласты кислой зоны образуют под ярким лучом много ассимилятов. Более вероятно, что различия рН цитоплазмы под щелочными и кислыми зонами сказываются на активности ферментов, участвующих в системе передачи и трансформации метаболического сигнала. Таким образом, терминальные стадии цепи передачи сигнала отличаются от стадий на начальном участке этой цепи повышенной чувствительностью к щелочному сдвигу рН на поверхности клетки [26]. Возможную роль в разной чувствительности проксимальных и дистальных сегментов сигнальной цепи играют неравные световые условия (интенсивные импульсы света в зоне экспорта метаболитов и непрерывное слабое освещение в зоне их импорта и дальнейшей переработки).

Представленный метод позволяет исследовать трансклеточный перенос метаболитов в клеточных цепочках [50]. Связь между клетками осуществляется по плазмодесмам — плазматическим тяжам, пронизывающим клеточные стенки. Плазмодесмы содержат отдельные нити актина, однако его содержание, по-видимому, недостаточно для поддержания сквозного течения цитоплазмы. Основной предполагаемый механизм прохождения ассимилятов через плазмодесмы — их диффузия. Предполагают, что проводимость плазмодесм подвержена тонкой регуляции. В качестве регулирующих факторов называют внутреннее гидростатическое давление, уровень Ca^{2+} в цитоплазме и другие. Традиционный подход к изучению проводимости плазмодесм состоит в том, что в клетку инъецируют флуоресцеин или его аналоги, а затем наблюдают за поступлением

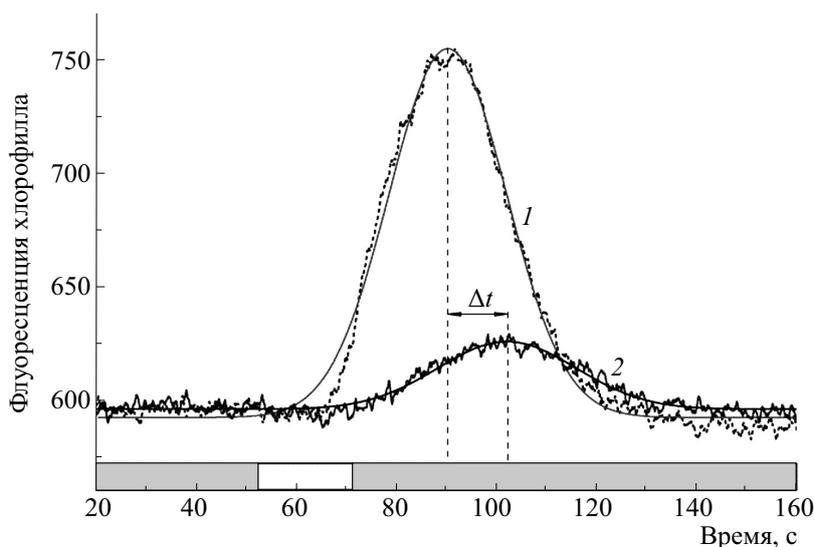


Рис. 3. Изменения флуоресценции хлорофилла F' , вызванные дистанционной передачей фотометаболитов в пределах одной интернодальной клетки (кривая 1) и в условиях их трансклеточного переноса между соседними междоузлиями (кривая 2). Расстояние между зоной локального освещения и областью измерения флуоресценции во внутриклеточной и трансклеточной конфигурациях было одинаковым ($d = 1$ мм).

зонда в соседние клетки [5, 6]. В сравнении с этим методом измерения флуоресценции хлорофилла имеют ряд преимуществ. Индикатором служит нативный флуоресцентный зонд — хлорофилл. Транспортируемые метаболиты образуются в физиологических количествах и только в цитоплазме. Отсутствует повреждение клетки, сопутствующее микроинъекции. Этот метод позволяет напрямую сравнивать перенос вещества по внутриклеточному и трансклеточному пути.

В двух используемых конфигурациях эксперимента источник света и область измерения разделены равным расстоянием, но в одном случае проксимальный и дистальный участки сигнальной цепи находятся в одной клетке, а в другом — в разных интернодальных клетках [50]. На рис. 3 показаны изменения флуоресценции F' , наблюдаемые при внутриклеточном и трансклеточном переносе метаболитов (кривые 1 и 2 соответственно). Судя по площади под кривой, из клетки в клетку проходит около 30% фотометаболитов от их количества, переносимого в клетке-доноре. Этот процент удивительно высок, принимая во внимание, что в торце интернодальной клетки поток цитоплазмы направлен тангенциально к клеточной стенке, а суммарная площадь сечения плазмодесм составляет <1% от пограничной межклеточной поверхности. Время преодоления межклеточного барьера составляет около 11 с и не зависит от расстояния между источником локального освещения и зоной измерения [50]. Зависимости времени достижения пика F' от разделяющего расстояния d при внутриклеточной и трансклеточной конфигурациях идут параллельно. Смещение по времени соответствует

преодолению трансклеточного барьера — одиночного слоя узловых клеток. Исходя из времени прохождения метаболита из клетки в клетку и данных о плотности расположения плазмодесм в пористой перегородке, можно оценить коэффициент диффузии метаболитов внутри плазмодесм. По нашим оценкам он составил $3.6 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$, что находится в близком соответствии с данными, полученными при микроинъекции флуорофоров на другом объекте (тычиночные волоски *Setcreasea purpurea*) [6].

Трансклеточный перенос метаболитов оказался весьма чувствителен к изменению осмотического давления среды. Замена стандартной среды на раствор с добавлением 0.15–0.20 М сорбита вызвала полное подавление трансклеточного переноса, но не оказывала влияния на внутриклеточный транспорт. Важно отметить, что осмотическое воздействие не оказывало влияния на скорость течения цитоплазмы и активность хлоропластов. Проводимость плазмодесм, блокируемая при повышении осмотического давления среды (при снижении внутреннего гидростатического давления) полностью восстанавливалась при отмывании клетки свежей средой. Полученные результаты заставляют пересмотреть сложившееся представление о том, что понижение внутреннего давления в клетках повышает проводимость плазмодесм [5, 51]. Результаты, полученные на интактных клетках, напротив, свидетельствуют о подавлении проводимости плазмодесм при осмотическом и солевом стрессе [50].

Таким образом, новый неинвазивный подход к изучению дальнего внутриклеточного и межклеточного транспорта уже дал разнообразные

новые сведения о роли циклоза в передаче метаболических сигналов и о свойствах плазмодесм. Одна из задач предстоящих исследований состоит в выяснении того, в каких пределах может меняться потребление и освобождение метаболитов хлоропластами на промежуточном сегменте сигнальной цепи при переходах свет–темнота и обратно. Вопросы микрофлюидной регуляции фотосинтеза, мембранных ионных потоков, нестационарных динамических структур и проводимости плазмодесм в норме и патологии представляют важное направление биофизики клетки и заслуживают дальнейшего изучения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 16-04-00318 и 20-54-12015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Tominaga and K. Ito, *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**, 104 (2015).
2. T. Shimmen, *J. Plant Res.* **120**, 31 (2007).
3. R. E. Goldstein and J.-W. van de Meent, *Interface Focus* **5**, 20150030 (2015).
4. W. F. Pickard, *Plant, Cell Environ.* **26**, 1 (2003).
5. K. J. Oparka and D. A. M. Prior, *Plant J.* **2** (5), 741 (1992).
6. E. B. Tucker and J. E. Tucker, *Protoplasma* **174**, 36 (1993).
7. T. Nishiyama et al., *Cell* **174**, 448 (2018).
8. V. Z. Lunevsky, O. M. Zherelova, I. Ya. Vostrikov, et al., *J. Membr. Biol.* **72** (1), 43 (1983).
9. G. N. Berestovsky and A. A. Kataev, *Eur. Biophys. J.* **34**, 973 (2005).
10. W. J. Lucas and R. Nuccitelli, *Planta* **150**, 120 (1980).
11. M. J. Beilby, T. Mimura, and T. Shimmen, *Protoplasma* **175**, 144 (1993).
12. A. A. Bulychev, A. A. Cherkashin, A. B. Rubin, et al., *Bioelectrochemistry* **53**, 225 (2001).
13. A. A. Bulychev, A. A. Polezhaev, S. V. Zykov, et al. *J. Theor. Biol.* **212**, 275 (2001).
14. N. A. Krupenina, A. A. Bulychev, M. R. G. Roelfsema, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 681 (2008).
15. N. A. Krupenina, A. A. Bulychev, and U. Schreiber, *Protoplasma* **248**, 513 (2011).
16. N. S. Allen and R. D. Allen, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, 497 (1978).
17. T. Shimmen and E. Yokota, *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 68 (2004).
18. T. McConnaughey, *Limnol. Oceanogr.* **36**, 619 (1991).
19. D. Menzel, *Protoplasma* **144**, 73 (1988).
20. I. Foissner and G. O. Wasteneys, *J. Microsc.* **247** (1), 10 (2012).
21. M. J. Beilby, *Front. Plant Sci.* **7**, 1052 (2016).
22. N. Kamiya, *Protoplasmic streaming* (Springer, Wien, 1959).
23. R. Scheibe, *Plant Physiol.* **96** (1), 1 (1991).
24. M. Taniguchi and H. Miyake, *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 252 (2012).
25. A. A. Bulychev, A. V. Alova, and A. B. Rubin, *Eur. Biophys. J.* **42**, 441 (2013).
26. A. A. Bulychev and A. A. Rybina, *Protoplasma* **255** (6), 1621 (2018).
27. A. V. Komarova, V. S. Sukhov, and A. A. Bulychev, *Funct. Plant Biol.* **45** (1–2), 236 (2018).
28. A. A. Bulychev and S. O. Dodonova, *Russ. J. Plant Physiol.* **58** (2), 233 (2011).
29. A. A. Bulychev and S. O. Dodonova, *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1221 (2011).
30. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Protoplasma* **251** (6), 1481 (2014).
31. A. A. Bulychev, in *Plant electrophysiology: methods and cell electrophysiology*, Ed. by A. G. Volkov, (Springer, Berlin, 2012), pp. 273–300.
32. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Biochemistry (Moscow)* **79** (3), 273 (2014).
33. А. А. Булычев, *Дальние взаимодействия и передача сигналов в клетках харовых водорослей. Тимирязевские чтения – 76* (Наука, М., 2017).
34. S. O. Dodonova and A. A. Bulychev, *Protoplasma* **248**, 737 (2011).
35. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 379 (2015).
36. I. Foissner and G. O. Wasteneys, *Plant Cell Physiol.* **48** (4), 585 (2007).
37. A. A. Bulychev and I. Foissner, *Plant Signal. Behav.* **12** (9), e1362518 (2017).
38. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Protoplasma* **254** (1), 557 (2017).
39. A. A. Bulychev, A. A. Rybina, and I. Foissner, in *Chloroplasts and cytoplasm: structure and functions*, Ed. by C. DeJesus and L. Trask (Nova Science, New York, 2018), pp. 1–24.
40. A. A. Bulychev and N. A. Krupenina, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* **2** (4), 387 (2008).
41. C. H. Foyer and G. Noctor, *Antioxid. Redox Signal.* **11** (4), 861 (2009).

42. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Biochim. Biophys. Acta* **1858** (5), 386 (2017).
43. A. A. Bulychev and N. A. Krupenina, *Bioelectrochemistry* **129**, 62 (2019).
44. Y. N. Antonenko and A. A. Bulychev, *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 279 (1991).
45. J. A. Feijó, J. Saihas, J. R. Hackett, et al. *J. Cell Biol.* **144** (3), 483 (1999).
46. A. A. Bulychev and N. A. Kamzolkina, *Bioelectrochemistry* **69**, 209 (2006).
47. A. A. Bulychev, N. A. Kamzolkina, J. Luengviriya, et al., *J. Membr. Biol.* **202** (1), 11 (2004).
48. A. A. Bulychev and N. A. Krupenina, *Plant Signal. Behav.* **4** (8), 24 (2009).
49. N. A. Krupenina and A. A. Bulychev, *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 781 (2007).
50. A. A. Bulychev, *Protoplasma* **256** (3), 815 (2019).
51. V. Hernández-Hernández, M. Benítez, and A. Boudaoud, *J. Exp. Bot.* **71** (3), 768 (2020). DOI: 10.1093/jxb/erz434.

Cytoplasmic Streaming as an Intracellular Conveyor: Effects on Photosynthesis and H⁺ Fluxes in *Chara* Cells

A.A. Bulychev, A.V. Alova, N.A. Krupenina, and A.B. Rubin

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

Giant internodal cells of characean algae perform a fast (up to 100 $\mu\text{m/s}$) rotational cytoplasmic flow, which ensures long-distance intracellular interactions and coordinates the functional activity of organelles under nonuniform illumination. Specific functions of the rapid cytoplasmic streaming remain poorly understood. Combining local illumination, measurements of chlorophyll fluorescence and extracellular pH at the cell regions located downstream of locally applied light spot gives a convenient tool for detecting the lateral transport of photometabolites and cyclosis-dependent regulation of photosynthesis and plasma-membrane H⁺ transport. Brightly illuminated chloroplasts export reducing equivalents and triose phosphates; the streaming fluid distributes these metabolites over the cell leading to a transient increase in chlorophyll fluorescence in areas of dim illumination away from the light source. The properties of cyclosis-mediated changes in fluorescence, including photoinduction of long-range interactions, sensitivity to metabolic inhibitors, inhomogeneous spatial distribution in illuminated cells, and the gradual (1–5 min) inactivation of long-distance signal transmission after placing the cell in darkness are considered. The stimulatory effect of the action potential on long-range signal transmission is shown. Application of a developed novel technique for the study of intercellular transport of metabolites and analysis of plasmodesmal permeability is discussed.

Keywords: cytoplasmic streaming, long-range signaling, heterogeneous pH profiles, remote regulation of photosystem II activity, plasmodesmata

АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ СИСТЕМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ PI3K–Akt–mTOR

© 2020 г. Т.С. Сапега*, **, Г.Т. Гурия*, **

*Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России
125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4

**Московский физико-технический институт,
141700, Долгопрудный Московской обл., Институтский пер., 9
E-mail: guria@blood.ru

Поступила в редакцию 20.11.2019 г.

После доработки 11.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Каскады системы внутриклеточной сигнализации MAPK и PI3K–Akt–mTOR регулируют важнейшие клеточные процессы. В рамках текущих представлений о взаимодействии данных каскадов сформулирована и исследована математическая модель. Анализ устойчивости модели сигнального пути PI3K–Akt–mTOR позволил установить, что основное состояние сигнальной системы является метастабильным, оно может быть пороговым образом активировано при закритической экзогенной стимуляции. Для величины порогового уровня внешней стимуляции получено явное выражение. Показано, что триггерные явления в динамике сигнальной системы описываются элементарной катастрофой типа «складка». Обсуждается возможное значение полученных результатов для молекулярной гематологии и гемостазиологии.

Ключевые слова: PI3K–Akt–mTOR, MAPK, внутриклеточная сигнализация, анализ устойчивости, активация тромбоцитов.

DOI: 10.31857/S0006302920020118

Каскад внутриклеточной сигнализации PI3K–Akt–mTOR (PI3K – фосфоинозитид 3-киназа; Akt – белки семейства протеинкиназ В, кодируемые генами АКТ, mTOR – мишень рапамицина млекопитающих) играет важную роль в регуляции жизненного цикла клетки в норме [1, 2] и при ряде патологий [3, 4]. Наиболее часто нарушения передачи сигнала по данному сигнальному пути обсуждаются в контексте злокачественного перерождения клетки [3–6]. По последним сообщениям, PI3K–Akt–mTOR путь участвует в процессах активации тромбоцитов, а также при развитии сосудистых мальформаций [7–9].

Совокупность реакций, обеспечивающих функционирование сигнальных каскадов, принято схематически изображать в виде ориентированных графов [10, 11]. Такой способ представления данных позволяет составить наглядное пред-

ставление о ключевых веществах, участвующих в передаче сигнала.

Авторы исходили из того, что метаболические сигнальные сети должны отвечать той же совокупности априорных требований, которые принято предъявлять ко всем иным сигнальным сетям, в частности электрическим. С этой точки зрения метаболические сети, находясь в ждущем режиме, должны быть готовы к срабатыванию при поступлении извне в должной степени выраженного сигнала и должны быть способны игнорировать недостаточно выраженные по амплитуде внешние сигналы. Именно такого рода пороговые свойства метаболических сетей, по существующим представлениям, ответственны за их срабатывание в ситуациях, когда это действительно необходимо [12]. Такое поведение позволяет клеткам экономить ресурсы, игнорируя фоновые и случайные сигналы [13]. Другими словами, основное – «ждущее» – состояние всякой метаболической системы должно быть устойчивым к достаточно широкому кругу внешних сигналов, амплитуда которых ниже некоторого порогового уровня. В этой связи анализ устойчивости основных состояний каждой конкретной

Сокращения: PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (phosphatidylinositol-3 kinase), Akt – белки семейства протеинкиназ В, кодируемые генами АКТ, mTOR – мишень рапамицина млекопитающих (mammalian target of rapamycin), MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы (mitogen-activated protein kinase).

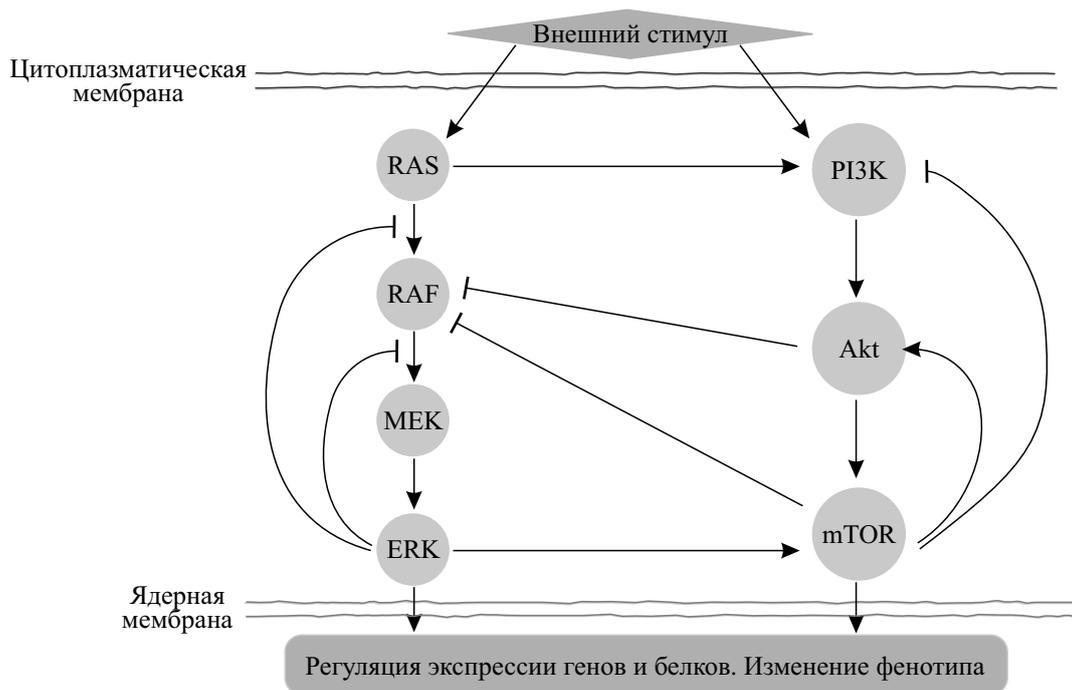


Рис. 1. Схема взаимодействия между сигнальными путями MAPK (белки RAS, RAF, MEK, ERK) и PI3K–Akt–mTOR (белки PI3K, Akt, mTOR) (адаптировано из [18]). Стрелки отображают стимулирующую передачу сигнала, а линии с тупым концом соответствуют негативной регуляции, ингибирующей прохождение сигнала.

метаболической сигнальной сети представляет большой интерес. Данный круг вопросов рассматривается в концептуальном плане в рамках теории метаболического контроля, являющейся сердцевиной современной системной биологии [14, 15].

В настоящей работе авторы ограничились анализом устойчивости каскада внутриклеточной сигнализации PI3K–Akt–mTOR, играющего важную роль в активации тромбоцитов и целого ряда иных клеток. Количественная оценка изменения функциональных свойств сигнальной системы клетки при вариации кинетических параметров ее отдельных элементов изучалась с использованием методов математического моделирования [16, 17].

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Система внутриклеточной сигнализации была исследована на основе диаграммы взаимодействия каскадов MAPK и PI3K–Akt–mTOR, предложенной в работе [18] (см. рис. 1).

Стоит отметить, что правая ветвь, содержащая петлю положительной обратной связи на диаграмме (Akt–mTOR–Akt), является важным маркером динамических свойств системы. Это свойство указывает на принципиальную возможность возбуждения данного контура. В результате становится возможным переключение сигнального

пути на автономное поддержание сигнала. Потому условия активации сигнального пути PI3K–Akt–mTOR представляют большой интерес.

В соответствии со схемой, представленной на рис. 1, характер взаимодействия основных элементов сигнального пути PI3K–Akt–mTOR можно представить в сокращенном виде (рис. 2а). При анализе кинетики процессов в данном каскаде концентрации основных белков [PI3K], [Akt] и [mTOR] были обозначены как $Y_1(t)$, $Y_2(t)$ и $Y_3(t)$ соответственно. Предполагалось, что концентрации можно рассматривать как динамические переменные, а константы скорости соответствующих реакций – k_1 , k_2 , k_{31} и k_{32} – в качестве параметров. Для обозначения констант скоростей пассивных утечек были введены параметры κ_1 , κ_2 , κ_3 . Величина экзогенного стимула была обозначена как S и рассматривалась как параметр. Учитывая введенные обозначения, диаграмма принимает вид, представленный на рис. 2б.

Динамика процессов, схематично представленных на рис. 2б, описывалась следующей системой обыкновенных дифференциальных уравнений:

$$\dot{Y}_1 = k_0 S - k_{31} Y_1 Y_3 - \kappa_1 Y_1, \tag{1}$$

$$\dot{Y}_2 = k_1 Y_1 - \kappa_2 Y_2 + k_{32} Y_3, \tag{2}$$

$$\dot{Y}_3 = k_2 Y_2 - \frac{\kappa_3 Y_3}{(1 + Y_3 / K_M)}, \tag{3}$$

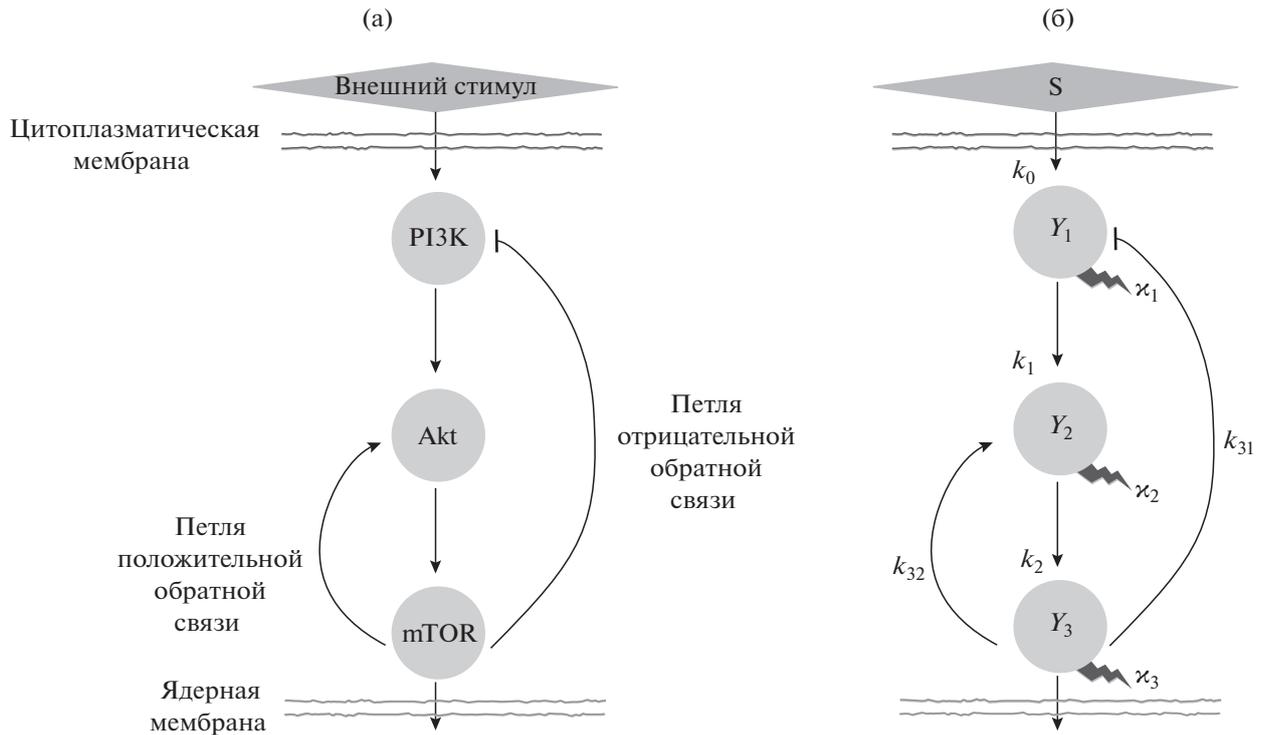


Рис. 2. Схематическая диаграмма каскада PI3K–Akt–mTOR, содержащая названия участвующих белков и обозначения петель обратных связей (а) и введенные символичные обозначения (б).

где символом K_M обозначена константа Михаэлиса.

Случай нулевой внешней стимуляции. Детальный анализ модели (см. Приложение) показывает, что в отсутствии внешних стимулов – $S \equiv 0$ – динамика рассматриваемой системы (уравнения (1)–(3)) может быть сведена к случаю $Y_1 \equiv 0$. Система становится двумерной и фактически определяется парой уравнений:

$$\dot{Y}_2 = -\kappa_2 Y_2 + k_{32} Y_3, \tag{4}$$

$$\dot{Y}_3 = k_2 Y_2 - \frac{\kappa_3 Y_3}{(1 + Y_3 / K_M)}. \tag{5}$$

Эволюция такой подсистемы была рассмотрена с помощью фазового портрета.

Если условие $\frac{\kappa_2 \kappa_3}{k_2 k_3} \geq 1$ выполняется, нуль-изоклины пересекаются ровно в двух точках, обозначенных на рисунке символами N и S . По характеру прилегающих к этим особым точкам траекторий видно, что точка N является устойчивым узлом, а точка S – седлом, в которое входят две особые линии – AS и BS . Иными словами, область притяжения состояния, которому соответствует точка N , ограничивается сепаратрисой ASB . При попадании изображающей точки с координатами (Y_2, Y_3) в любую точку области вне этого «бассейна» притяжения соответствующая

фазовая кривая после некоторого приближения к одной из нуль-изоклин будет демонстрировать тенденцию к неограниченному росту обеих переменных во времени.

Случай ненулевой внешней стимуляции. Для анализа ситуации в общем случае были введены безразмерные переменные:

$$y_1 = \frac{k_1 k_2}{K_M} Y_1, \tag{6}$$

$$y_2 = \frac{k_2}{K_M} Y_2, \tag{7}$$

$$y_3 = \frac{1}{K_M} Y_3. \tag{8}$$

Уровень внешней стимуляции отображен величиной параметра Ω :

$$\Omega = \frac{k_0 k_1 k_2 S}{K_M}. \tag{9}$$

В безразмерных переменных система уравнений (1)–(3) принимает следующий вид:

$$\dot{y}_1 = \Omega - y_1 (\kappa_1 + k_{31} K_M y_3), \tag{10}$$

$$\dot{y}_2 = y_1 - \kappa_2 y_2 + k_2 k_{32} y_3, \tag{11}$$

$$\dot{y}_3 = y_2 - \frac{\kappa_3 y_3}{1 + y_3}. \tag{12}$$

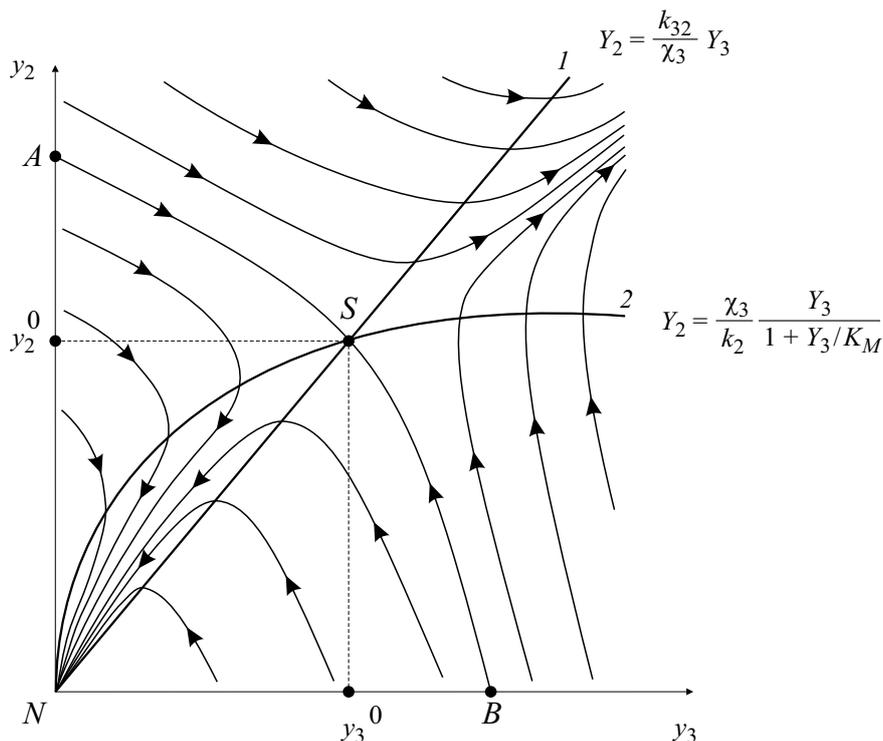


Рис. 3. Фазовый портрет динамической системы (4)–(5). Линии 1 и 2 – нуль-изоклины. Особые точки: N – устойчивый узел, S – седло. Сепаратриса ASB разделяет два динамических режима в фазовом пространстве системы: релаксация к устойчивому исходному состоянию и передача сигнала с нарастанием динамических переменных.

Стационарные состояния системы определяются следующей системой уравнений:

$$0 = \Omega - y_1^0 (\kappa_1 + k_{31}K_M y_3^0), \tag{13}$$

$$0 = y_1^0 - \kappa_2 y_2^0 + k_2 k_{32} y_3^0, \tag{14}$$

$$0 = y_2^0 - \frac{\kappa_3 y_3^0}{1 + y_3^0}. \tag{15}$$

Легко показать, что у системы уравнений (13)–(15) существует единственное нетривиальное решение, только если выполнено следующее условие:

$$\frac{\Omega}{(\kappa_1 + k_{31}K_M y_3^0)} - \frac{\kappa_2 \kappa_3 y_3^0}{1 + y_3^0} + k_2 k_{32} y_3^0 = 0. \tag{16}$$

Условие (16) является основополагающим для дальнейшего анализа. Оно, по сути, является условием разрешимости системы уравнений (13)–(15). Оно может быть представлено в следующем виде:

$$\sigma (1 + y_3^0) = y_3^0 (\varepsilon + y_3^0) (\delta - y_3^0), \tag{17}$$

где использованы следующие обозначения:

$$\sigma = \frac{\Omega}{k_2 k_{31} k_{32} K_M}, \tag{18}$$

$$\varepsilon = \frac{\kappa_1}{k_{31} K_M}, \tag{19}$$

$$\delta = \frac{\kappa_2 \kappa_3}{k_2 k_3} - 1 > 0. \tag{20}$$

При величине σ меньше определенного уровня $\sigma^\#$, соответствующее значение y_3^0 принадлежит интервалу $[0, \delta]$. Выражение для $\sigma^\#$ может быть найдено из уравнения (17) и принимает следующий вид:

$$\sigma^\# = \max_{0 < x < \delta} \left[\frac{x(x + \varepsilon)(\delta - x)}{1 + x} \right]. \tag{21}$$

В случае гиперстимуляции ($\sigma > \sigma^\#$) система не имеет положительных стационарных состояний. Это означает, что если уровень внешней стимуляции превышает критическое значение $\sigma^\#$, имеет место место триггерная активация сигнального пути и запуск передачи сигнала.

При любых значениях параметров $\delta, \varepsilon, \sigma$ уравнение (17) задает кубический полином относительно переменной y_3^0 . Его решение дает возможность отыскать y_3^0 , а затем y_1^0 и y_2^0 через уравнения (14) и (15). Таким образом, перечень всех возможных стационарных решений системы уравне-

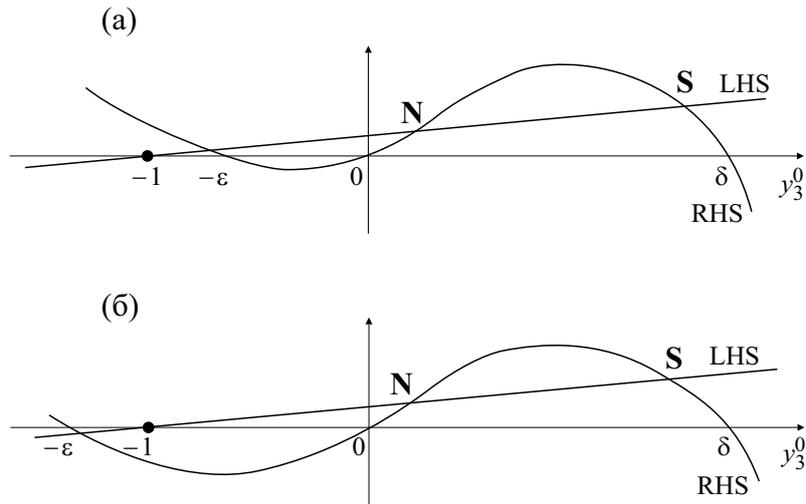


Рис. 4. Графическое представление решений уравнения (17). Рассмотрены два варианта расположения точек пересечения: а) $\varepsilon < 1$ и б) $\varepsilon > 1$. В обоих случаях один из корней нефизичен (отрицательное значение концентрации). Далее при рассмотрении ограничение на параметр $\varepsilon > 0$.

ний (10)–(12) определяется ровно тремя параметрами – δ , ε и σ (уравнения (18)–(20)).

Левая часть уравнения (17) по отношению к y_3^0 геометрически представляет собой прямую с коэффициентом наклона σ , проходящую через ось абсцисс при $y_3^0 = -1$. А правая часть – кубическую параболу с корнями $y_3^0 = -\varepsilon$, $y_3^0 = 0$, $y_3^0 = \delta$. Решениям уравнения (17) будут отвечать точки пересечения прямой и кубической параболы (рис. 4):

Поскольку величина y_3^0 , согласно уравнению (8), соответствует перенормированной концентрации белка mTOR, она по смыслу не может принимать отрицательные значения. Из рис. 4 видно, что уравнение (17) может иметь не более двух неотрицательных решений (отмечены на рисунке символами N и S). Так, например, при $\sigma = 0$ корнями являются $y_3^0 = 0$ и $y_3^0 = \delta$.

При увеличении значения σ до момента касания прямой с дугой кубической параболы при $\sigma = \sigma^\#$ уравнение (17) будет иметь ровно один неотрицательный корень. Также ясно, что при значении параметра $\sigma > \sigma^\#$ прямая на рис. 4 будет проходить выше дуги параболы, следовательно, уравнение (17) не будет иметь решений всюду при $y_3^0 > 0$, т. е. у системы уравнений (10)–(12) не будет стационарных состояний с неотрицательным значением y_3^0 .

Прямое исследование устойчивости стационарных состояний, которым отвечают точки пересечения прямой с кубической параболой, показало, что для всякого σ из интервала $0 < \sigma < \sigma^\#$ из двух точек пересечения прямой и параболы в неотрицательной области (см. рис. 4) левая – N – всегда отвечает устойчивому узлу, а правая – S – седлу. Это значит, что при допороговых уровнях внешней стимуляции ($\sigma < \sigma^\#$) система внутриклеточной сигнализации может находиться в ждущем режиме, в котором значению нормированной концентрации белка mTOR отвечает младший из положительных корней уравнения (17).

Поскольку расстояние между корнями уравнения (17) может рассматриваться как мера величины порога динамической активации, самое высокое значение порога достигается при $\sigma = 0$. И напротив, при повышении значения σ до предельного $\sigma^\#$ величина порога динамической потери устойчивости падает до нуля. Стационарные состояния системы уравнений (10)–(12) сближаются при увеличении параметра σ . Ветви решений, представляющие собой нормированные устойчивые (N) и неустойчивые (S) стационарные концентрации белка mTOR, сливаются при $\sigma = \sigma^\#$. Бифуркационная диаграмма выглядит следующим образом (см. рис. 5).

Для заданных параметров δ и ε можно получить числовое значение $\sigma^\#$. Зависимость уровня критической стимуляции $\sigma^\#$ от двух других параметров модели может быть представлена в виде графика в трехмерном пространстве (рис. 6).

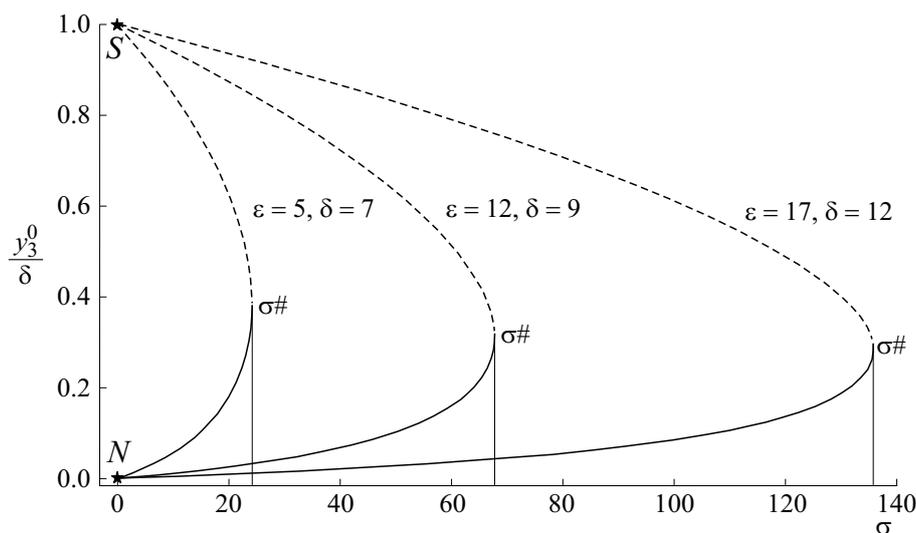


Рис. 5. Бифуркационная диаграмма катастрофы типа складка. Ветвь решений, соответствующая траектории устойчивого узла N , отображена сплошной линией, а седловой точки S – штриховкой. Решения, отображающие нормированные устойчивую (N) и неустойчивую (S) стационарные концентрации белка mTOR, сливаются при критическом значении $\sigma = \sigma^\#$.

РЕЗУЛЬТАТЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Из проведенного анализа следует, что система, описываемая уравнениями (10)–(12), демонстрирует отчетливое триггерное поведение. Действительно, представим себе, что подсистема (11)–(12) находится в своем основном невозмущенном состоянии $y_2^0 = 0, y_3^0 = 0$. Если в некий момент времени одна из ее динамических переменных (возьмем, для определенности, y_3) будет импульсно увели-

чена сверх определенного предела (станет больше значения y_3 в точке B , показанной на рис. 3), тогда дальнейшая эволюция системы во времени не будет представлять собой релаксацию в исходное состояние. Напротив, обе динамические переменные y_3 и y_2 будут демонстрировать асимптотическое стремление к неограниченному росту. С точки зрения теории управления, это означает, что рассматриваемая система демонстрирует способность к триггерной динамической активации.

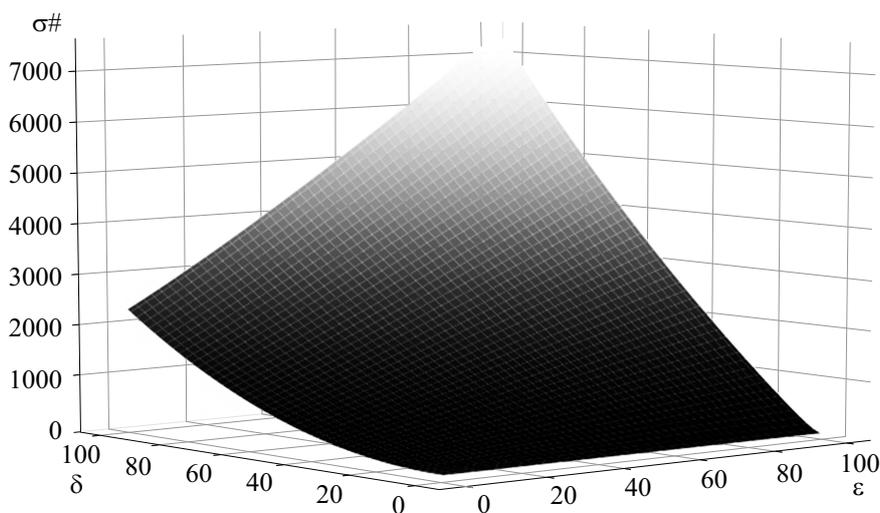


Рис. 6. Зависимость критической величины пороговой стимуляции $\sigma^\#$ от кинетических параметров модели δ и ϵ .

При этом из рис. 3 видно, что импульсная стимуляция по любой из переменных, не выводящая изображающую точку за пределы бассейна притяжения, завершится асимптотической релаксацией в исходное стационарное состояние N . Можно сказать, что область динамической устойчивости основного состояния фактически определяется размером прилегающего к точке N бассейна притяжения. Его размер характеризуется расстоянием между особыми точками N и S (длинной отрезка NS). При изменении кинетических параметров системы ($\kappa_2, \kappa_3, k_2, k_3, K_M$) длина NS будет меняться, так что при определенных условиях два корня могут выродиться в один. В таких случаях основное состояние системы испытывает параметрическую дестабилизацию, становится абсолютно неустойчивым, как следствие, при сколь угодно малом возмущении каскад активируется.

Порог динамической дестабилизации — величина внешнего импульса, необходимого для триггерной активации сигнального пути, — снижается по мере увеличения параметра σ до предельного значения $\sigma^\#$: уменьшается расстояние между точками пересечения прямой и параболы на рис. 4. Это указывает на то, что бассейн притяжения устойчивого стационарного состояния сужается.

ДИСКУССИЯ

В настоящей работе анализ устойчивости стационарных состояний сигнального пути PI3K—Akt—mTOR основывался на ориентированных графах, которые используют специалисты по молекулярной гематологии [18]. С математической точки зрения, анализ устойчивости проводился в соответствии со стандартными процедурами, восходящими к работам А.М. Ляпунова [19]. Полученные результаты поддаются рациональной интерпретации: в частности, заключение о том, что только три истинных параметра ($\delta, \varepsilon, \sigma$) описывают пороговые явления в сложной регуляторной системе, динамика которой зависит от девяти параметров, представляется очень важным. Найденное выражение для величины порога активации, а также оценки размеров области притяжения на фазовой плоскости открывают новые возможности для интерпретации данных, представляющих клинический интерес. Можно предположить, что аналогичные подходы, не перегруженные деталями, могут быть полезны и для изучения взаимодействия между другими сигнальными путями, интегрированными во внутриклеточную сигнальную сеть [15, 20].

В данной работе авторы сконцентрировались на анализе поведения изолированного пути PI3K—Akt—mTOR, оставив за рамками рассмот-

рения MAPK-каскад. При анализе диаграммы взаимодействия между сигнальными путями (см. рис. 1) с точки зрения теории управления легко понять, что ведущая роль принадлежит каскаду PI3K—Akt—mTOR. Контур самоусиления между Akt и mTOR образует автокаталитическое ядро, которое отвечает за фундаментальную возможность порогового возбуждения рассматриваемой системы, в то время как MAPK играет роль дополнительного стимулятора. Авторы исходили из следующего: при недостаточно выраженной стимуляции (по амплитуде или длительности воздействия) сигнал может затухнуть вследствие ограниченного времени жизни белков, диффундирующих к ядру клетки через насыщенный цитозоль. При прекращении внешней стимуляции процессы передачи сигнала определяются кинетикой автокаталитического ядра. Все остальные элементы, обозначенные на диаграмме, не могут работать автономно — их активация зависит от экзогенных стимулов. При допороговом уровне внешней стимуляции каскада PI3K—Akt—mTOR возможна динамическая потеря устойчивости. При этом величина динамического порога активации зависит от стимулирующего действия со стороны сигнального пути MAPK: генерируемый им импульс, может вызывать пороговое возбуждение автокаталитической петли Akt—mTOR. Анализ дополнительной стимуляции сигнального пути PI3K—Akt—mTOR посредством MAPK-каскад приведен в Приложении.

Сигнальная система PI3K—Akt—mTOR способна находиться в метастабильном стационарном состоянии: при превышении уровнем внешней стимуляции порогового значения происходит запуск автокаталитического ядра каскада и становится возможной автоволновая передача сигнала от внешней мембраны к ядру клетки. В основном, «ждущем» режиме отфильтровываются шумовые сигналы, стационарные концентрации белков автокаталитического ядра релаксируют к нулю. Из приведенного в работе анализа ясно, что основное состояние предоставленной себе системы ($S = 0$) может испытывать как динамическую, так и параметрическую потерю устойчивости. В отличие от динамических неустойчивостей, развивающихся в ответ на мгновенные импульсные изменения динамических переменных, как в случае стимуляции MAPK-каскадом, параметрические неустойчивости могут быть следствием плавных и медленных изменений во времени каких-либо кинетических параметров системы. Такие изменения, по мнению авторов, могут иметь место при генетических мутациях, сопровождающихся изменением активности белков, что ведет к количественному изменению соответствующих кинетических параметров системы. Это отображается в рамках модели изменением бассейна притяжения к основному состоянию

системы. Таким образом, клетки с мутациями в определенных генах могут стать более чувствительными к экзогенным стимулам, запускающим каскад: они оказываются способными порогово реагировать на возмущения, которые в норме игнорируются.

В последнее время число публикаций, касающихся сигнального пути PI3K–Akt–mTOR в связи с процессами активации тромбоцитов, быстро растет [21, 22]. Опубликованы новые данные об ингибировании элементов каскада, подавляющего адгезию тромбоцитов и образование тромба [23]. Таким образом, потеря устойчивости сигнального каскада PI3K–Akt–mTOR может играть важную роль в процессах тромбообразования.

Стоит отметить, что при активации тромбоцитов, наряду с подробно проанализированной в данной работе кинетической системой внутренней сигнализации с участием PI3K–Akt–mTOR, важную роль играет и межклеточная сигнализация. Ниже описаны два механизма активации тромбоцитов, задействующие рассмотренный сигнальный путь.

Одним из этих механизмов является прямая стимуляция тромбоцитов протромботическим агентом: взаимодействие рецептора тромбосана с тромбосаном A2 приводит к активации рецептора, связанного с G-белком. Его димерный комплекс Gβγ передает сигнал, вызывая активацию субъединиц PI3K и p44 / 42 MAPK (ERK1/2) [24]. При этом сигнальные пути MAPK и PI3K–Akt–mTOR участвуют в процессах секреции гранул тромбоцитов, которые выбрасываются с тромбосаном A2 [7, 25].

Другим механизмом является активация «изнутри наружу»: связывание коллагена с GPVI рецепторами тромбоцитов стимулирует фосфорилирование специфических остатков тирозина на внутренней стороне мембраны, которые в свою очередь рекрутируют сигнальные белки, в том числе PI3K [26], что ведет к высвобождению тромбосана A2 во внеклеточную среду [7]. Далее, будучи сильным протромботическим веществом, продуцируемым активированными тромбоцитами, тромбосан A2 стимулирует активацию и агрегацию новых тромбоцитов.

Инициирование тромбосана A2, образующимся в ходе реакции по второму механизму, ведет к реализации первого механизма, который сам по себе является автокаталитическим. Такое поведение аналогично проанализированному поведению каскадов MAPK и PI3K–Akt–mTOR. Таким образом, активация тромбоцитов существенно зависит от самоподдерживающихся процессов, в которых важную роль играет динамическая дестабилизация системы внутриклеточной сигнализации PI3K–Akt–mTOR.

ПРИЛОЖЕНИЕ

I. Отсутствие внешней стимуляции. Анализ системы уравнений (1)–(3) показывает, что при отсутствии сигнала извне ($S \equiv 0$) рассматриваемая система имеет два стационарных состояния. Одно из них выглядит как

$$Y_1^0 = 0, \tag{S1}$$

$$Y_2^0 = 0, \tag{S2}$$

$$Y_3^0 = 0. \tag{S3}$$

а второе –

$$Y_1^0 = 0,$$

$$Y_2^0 = \frac{k_{32}K_M}{\kappa_2} \left[\frac{\kappa_2\kappa_3}{k_2k_3} - 1 \right], \tag{S5}$$

$$Y_3^0 = K_M \left[\frac{\kappa_2\kappa_3}{k_2k_3} - 1 \right]. \tag{S6}$$

Легко видеть, что второе решение принадлежит области $Y_1^0 \geq 0$, $Y_2^0 \geq 0$, и $Y_3^0 \geq 0$ лишь при выполнении условия

$$\mu \equiv \frac{\kappa_2\kappa_3}{k_2k_3} \geq 1. \tag{S7}$$

Тогда в отсутствие внешнего стимула рассматриваемая сигнальная система формально может находиться в одном из двух стационарных состояний: либо в состоянии (S1)–(S3), либо в состоянии (S4)–(S6). Для того чтобы ответить, в каком именно состоянии способна реально находиться система, надлежит исследовать оба стационарных состояния на устойчивость.

Прямое исследование по первой «методе» А.М. Ляпунова [19] при выполнении условия (S7) позволяет найти, что стационарное состояние (S1)–(S3) является асимптотически устойчивым по отношению к малым отклонениям: все три ляпуновских показателя отрицательны. Таким образом, решение (S1)–(S3) является узлом в фазовом пространстве рассматриваемой системы уравнений (1)–(3). Аналогичное исследование стационарного решения (S4)–(S6) показывает, что из трех показателей Ляпунова один является положительным, а два других отрицательны. Это значит, что данное решение является седлом в фазовом пространстве, т.е. оно неустойчиво к сколь угодно малым возмущениям, а потому не может быть физически реализовано.

Кроме того, из анализа изложенного следует, что при полном отсутствии внешней стимуляции (случай $S \equiv 0$) динамика рассматриваемого сиг-

нального пути фактически определяется парой уравнений на Y_2 и Y_3 :

$$\dot{Y}_2 = -\kappa_2 Y_2 + k_{32} Y_3, \quad (S8)$$

$$\dot{Y}_3 = k_2 Y_2 - \frac{\kappa_3 Y_3}{(1 + Y_3 / K_M)}. \quad (S9)$$

II. Стимуляция mTOR посредством ERK. Как видно из рис. 1, белок ERK способен напрямую активировать mTOR. Этот эффект может быть формально учтен, если добавить дополнительный член в уравнение (12). Тогда система (10)–(12) принимает следующий вид:

$$\dot{y}_1 = \Omega - y_1(\kappa_1 + k_{31} K_M y_3), \quad (S10)$$

$$y_2 = y_1 - \kappa_2 y_2 + k_2 k_{32} y_3, \quad (S11)$$

$$y_3 = \Lambda + y_2 \frac{\kappa_3 y_3}{1 + y_3}, \quad (S12)$$

где Λ – величина, пропорциональная концентрации белка ERK.

С учетом Λ -члена при поиске стационарного состояния одна из нуль-изоклин сместится вниз на величину Λ :

$$y_2 = \frac{\kappa_3 y_3}{1 + y_3} - \Lambda. \quad (S13)$$

Выражение для σ принимает следующий вид:

$$\begin{aligned} \sigma &= \frac{y_3(\varepsilon + y_3)(\delta - y_3)}{1 + y_3} - \frac{\kappa_2}{k_2 k_{32}} \Lambda (\varepsilon + y_3) = \\ &= \frac{y_3(\varepsilon + y_3)(\delta - y_3)}{1 + y_3} - \lambda(\varepsilon + y_3), \end{aligned} \quad (S14)$$

где введен безразмерный параметр

$$\lambda = \frac{\kappa_2}{k_2 k_{32}} \Lambda. \quad (S15)$$

Условие разрешимости принимает следующий вид:

$$\sigma(1 + y_3^0) = y_3^0(\varepsilon + y_3^0)(\delta - y_3^0) - \lambda(\varepsilon + y_3^0)(1 + y_3^0). \quad (S16)$$

Тогда выражение для значения пороговой стимуляции с учетом λ -члена принимает вид:

$$\sigma^\lambda = \max_{0 < x < \delta} \left[\frac{x(x + \varepsilon)(\delta - x)}{1 + x} - \lambda(\varepsilon + x) \right]. \quad (S17)$$

Сравнение выражений (21) и (S17) показывает, что в присутствии λ -члена ($\lambda > 0$) амплитуда критического уровня стимуляции σ^λ меньше $\sigma^\#$. Чем больше значение λ , тем меньше значение σ^λ . Следовательно, MAPK-каскад способен обеспечить параметрическую дестабилизацию сигнального пути PI3K–Akt–mTOR.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-11-00260).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al., *Molecular Biology of the Cell* (Garland, NY, 2002).
2. M. J. Berridge, *Cell Signalling Biology* (2012). DOI:10.1042/csb0001012
3. *Molecular Oncology*, Ed. by M. Bishop and R. A. Weinberg (Mosby, 1996).
4. N. Dey, P. De, B. Leyland-Jones, *PI3K-mTOR in Cancer and Cancer Therapy* (Humana Press, NY, 2016).
5. J. Bertacchini, N. Heidari, L. Mediani, et al., *Cell. Mol. Life Sci.* **72** (12), 2337 (2015).
6. M. Compagno, Q. Wang, C. Pighi, et al., *Nature* **542** (7642), 489 (2017).
7. Z. Li, M. K. Delaney, K. A. O'Brien, and X. Du, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30** (12), 2341 (2010).
8. G. F. Guidetti, I. Canobbio, and M. Torti. *Adv. Biol. Regul.* **59**, 36 (2015).
9. A. Martinez-Lopez, L. Salvador-Rodriguez, T. Montero-Vilchez, et al., *Curr. Opin. Pediatrics* **31** (6), 747 (2019).
10. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=hsa04151&show_description=show.
11. <http://public.ndexbio.org/#/network/4bb7e76c-1e5f-11e8-b939-0ac135e8bacf>.
12. B. Pfeuty and K. Kaneko. *Phys. Rev. E* **89** (2), 022707 (2014).
13. М. Ичас, *О природе живого: механизмы и смысл* (Мир, М., 1994).
14. В. Ø. Palsson, *Systems biology: properties of reconstructed networks* (Cambridge University Press, Cambridge, 2006).

15. В. N. Kholodenko, A. Kiyatkin, F. J. Bruggeman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (20), 12841 (2002).
16. Ю. М. Романовский, Н. В. Степанова и Д. С. Чернавский, *Математическая биофизика* (Наука, М., 1975).
17. Г. Ю. Ризниченко, *Лекции по математическим моделям в биологии*, изд. 2-е, испр. и дополн. (РХД, М., 2011).
18. И. А. Якутик, Л. С. Аль-Ради, Б. В. Бидерман и др., *Гематология и трансфузиология* **63**, 112 (2018).
19. А. М. Ляпунов, *Общая задача об устойчивости движения* (АН СССР, М., 1948).
20. A. Nair, P. Chauhan, B. Saha, and K. F. Kubatzky, Int. J. Mol. Sci. **20** (13), 3292 (2019).
21. D. S. Shen, Y. J. Yang, X. J. Kong, et al., Eur. J. Pharmacol. **852**, 1 (2019).
22. Z. Chen, T. Li, K. Kareem, et al., Artificial organs **43** (9), 897 (2019).
23. T. Später, I. Müller, H. Eichler, et al., Platelets **29** (3), 277 (2018).
24. J. M. Gibbins, S. Briddon, A. Shutes, et al., J. Biol. Chem. **273** (51), 34437 (1998).
25. P. Flevaris, Z. Li, G. Zhang, et al., Blood **113** (4), 893 (2009).
26. N. Nakahata, Pharmacol. Therap. **118** (1), 18 (2008).

Stability Analysis of PI3K–Akt–mTOR Intracellular Signaling Pathway

T.S. Sapega*, ** and G.Th. Guria*, **

*National Research Center for Hematology, Novozykovskii proezd 4, Moscow, 125167 Russia

**Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia

The MAPK and PI3K–Akt–mTOR intracellular signaling cascades regulate important cellular processes. A mathematical model was designed and used for the analysis based on current knowledge of the interactions that occur within these cascades. Stability analysis of the PI3K–Akt–mTOR signaling pathway model showed that the ground state of the signaling pathway is metastable and signal transduction can be activated by overcritical exogenous stimulation. An explicit expression was obtained for the threshold level of external stimuli. It was shown that triggering events in the dynamics of the signaling pathway are described by the Fold catastrophe of the Elementary theory. A discussion about whether the results obtained are significant for molecular hematology and hemostasiology is presented.

Keywords: PI3K–Akt–mTOR, MAPK, intracellular signaling, stability analysis, platelet activation

ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ В РАЦИОНЕ НУТРИЕНТОВ

© 2020 г. О.Н. Волощук, Г.П. Копыльчук, К.А. Тазырова

Институт биологии, химии и биоресурсов Черновицкого национального университета им. Ю. Федьковича, 58012, Черновцы, ул. Леси Украинки, 25, Украина

E-mail: o.voloschuk@chnu.edu.ua

Поступила в редакцию 03.06.2019 г.

После доработки 13.12.2019 г.

Принята к публикации 17.12.2019 г.

Исследована активность изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также NADH-убихинонредуктазы в митохондриальной фракции печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Результаты исследований показали, что для животных, содержащихся на высокосахарозном рационе, характерна тенденция к снижению изоцитратдегидрогеназной и малатдегидрогеназной активности, а также снижение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы в 2.5 раза. При этом для животных, содержащихся в условиях высокосахарозного рациона, характерно сохранение активности NADH-убихинонредуктазы на уровне контрольных значений. В то же время в митохондриальной фракции печени животных, получавших высокосахарозный/низкобелковый рацион, наблюдается значительное снижение ферментативных активностей NAD⁺-зависимых ферментов цикла Кребса при одновременном снижении активности NADH-убихинонредуктазы более чем 2.5 раза в сравнении с показателями контроля, что может рассматриваться как одно из звеньев механизма регуляции клеточной энергетики в условиях нарушений сбалансированности рациона сахарозой и пищевым белком. Полученные результаты могут быть использованы для разработки стратегии коррекции метаболических нарушений при разной обеспеченности рациона нутриентами.

Ключевые слова: изоцитратдегидрогеназа, α -кетоглутаратдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, NADH-убихинонредуктаза, печень, нутриенты.

DOI: 10.31857/S000630292002012X

Вопрос возможных механизмов формирования метаболических нарушений в условиях нутритивного дисбаланса в настоящее время остается открытым [1–3]. В рационе современного человека преобладают легкоусвояемые углеводы, насыщенные жиры на фоне снижения обеспеченности полноценным пищевым белком. При этом хроническое употребление большого количества сахарозы и алиментарная недостаточность белка могут выступать предикторами индуцирования и прогрессии метаболических нарушений [4, 5].

Одним из ключевых механизмов дисметаболических изменений может выступать нарушение процессов энергообеспечения клеток. Нарушение механизмов биотрансформации энергии рассматриваются как определяющие для повреждения и гибели клеток [6]. При этом печень является основным органом, регулирующим энергетический метаболизм в организме в целом [7, 8]. Поддержание работы системы энергообеспечения гепатоцитов необходимо не только для обес-

печения энергозависимых реакций, но и для активации компенсаторных механизмов, направленных на коррекцию и устранение возникших повреждений.

Ключевыми реакциями, обеспечивающими поддержание необходимого клетке уровня NADH, поставщика электронов для работы дыхательной цепи и обеспечения окислительного фосфорилирования, являются NAD⁺-зависимые реакции цикла Кребса. Поскольку цикл Кребса является связующим звеном многих метаболических путей, обеспечивает организм не только восстановленными коферментами, но утилизирует и поставляет субстраты для целого ряда биохимических реакций, то вопросы, связанные с регуляцией его функционирования, вызывают особый интерес [9].

Целью нашей работы было определение активности изоцитратдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, а также NADH-убихинонредуктазы в митохондриях пе-

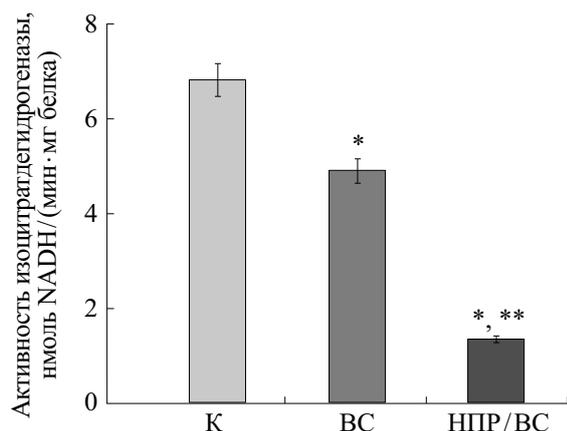


Рис. 1. Активность изоцитратдегидрогеназы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения: К – крысы, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе, контроль; ВС – крысы, содержащиеся на высокосахарозном рационе; НПР/ВС – крысы, содержащиеся на высокосахарозном/низкобелковом рационе. * – Достоверная разница по сравнению с контролем; ** – достоверная разница по сравнению с группой животных, содержащихся на высокосахарозном рационе.

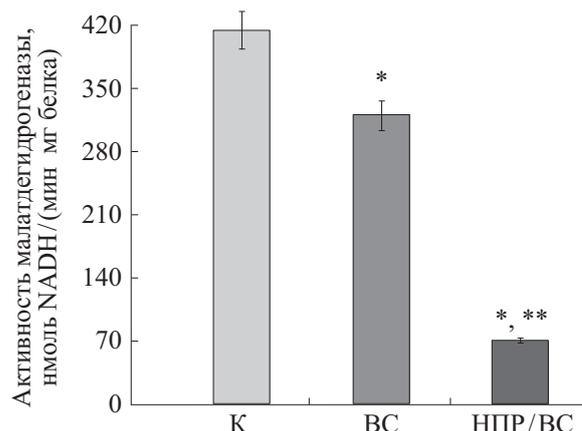


Рис. 2. Активность малатдегидрогеназы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения, как на рис. 1.

чени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 36 белых нелинейных крысах массой 110–130 г и возрастом 2.0–2.5 месяца.

Крыс содержали по одной в пластмассовых клетках с песчаной подстилкой, доступ к воде *ad libitum*. Нормирование суточного рациона проводили с учетом принципа парного питания.

Исследования проводили на трех группах животных: группа I – крысы, содержащиеся на полноценном полусинтетическом рационе (контроль); группа II – крысы, содержащиеся на высокосахарозном рационе; группа III – крысы, содержащиеся на высокосахарозном/низкобелковом рационе.

Животные группы I получали рацион, содержащий 14% белка (в виде казеина), 10% жиров, 10% сахарозы, сбалансированный по всем нутриентам [10]. Животные группы II получали высокосахарозный рацион, включающий 40% сахарозы и сбалансированный по всем другим нутриентам [11]. Животные группы III получали высокосахарозный/низкобелковый рацион, включающий 4.7% белка, 40% сахарозы и сбалансированное соотношение микронутриентов.

Длительность эксперимента составляла 28 суток. Цервикальную дислокацию крыс под легким эфирным наркозом осуществляли на 29-е сутки эксперимента. Выделение митохондриальной фракции из гомогената печени проводили методом дифференциального центрифугирования при 0–3°C [12].

Активность NAD^+ -зависимых дегидрогеназ цикла Кребса в митохондриальной фракции печени определяли спектрофотометрически. Активность изоцитратдегидрогеназы регистрировали по накоплению NADH в реакции превращения изоцитрата в α -кетоглутарат [13], активность малатдегидрогеназы – по накоплению NADH в реакции окисления малата [14]. Активность α -кетоглутаратдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по интенсивности окисления α -кетоглутарата при $\lambda = 417$ нм [15]. Активность NADH-убихинонредуктазы определяли спектрофотометрически и рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [16].

Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований показали, что для животных, содержащихся на высокосахарозном рационе, характерна тенденция к снижению изоцитратдегидрогеназной (рис. 1) и малатдегидрогеназной (рис. 2) активности. При этом актив-

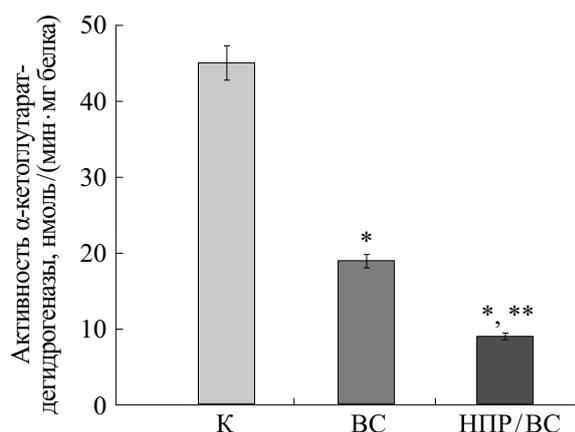


Рис. 3. Активность α-кетоглутаратдегидрогеназы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения, как на рис. 1.

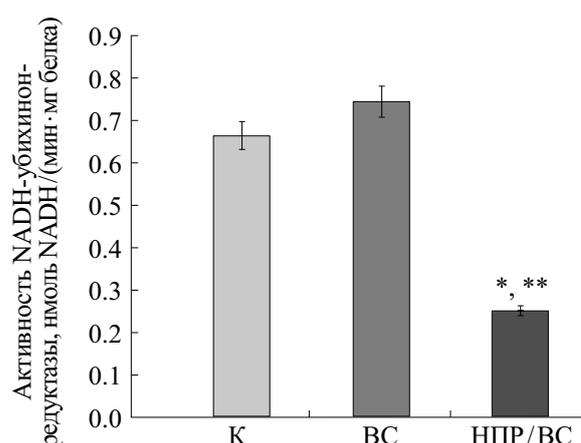


Рис. 4. Активность NADH-убихинонредуктазы в митохондриях печени крыс, содержащихся в условиях различной обеспеченности рациона сахарозой и протеином. Обозначения, как на рис. 1.

ность α-кетоглутаратдегидрогеназы снижается в два с половиной раза (рис. 3). Вероятно, усиленное торможение α-кетоглутаратдегидрогеназы будет сопровождаться накоплением α-кетоглутарата с последующим его использованием в других метаболических путях. В первую очередь при нарушении окисления α-кетоглутарата в митохондриях наблюдается накопление цитрата, первого продукта цикла Кребса, что будет сопровождаться выходом его в цитозоль с последующим преобразованием обратно в ацетил-КоА и использованием для биосинтеза липидов [17]. В литературе показано, что для активности α-кетоглутаратдегидрогеназы существует порог, который может быть существенно подавлен, прежде чем повлияет на максимальную скорость потребления кислорода [18], поэтому уровни NADH могут широко варьировать, прежде чем стать ограничивающим фактором для клеточного дыхания. Этот факт позволяет предположить, что любое снижение активности α-кетоглутаратдегидрогеназы может рассматриваться как первая попытка адаптировать метаболизм путем модуляции цикла Кребса, прежде чем нарушать функцию дыхательной цепи. Учитывая роль α-кетоглутаратдегидрогеназы в процессах биотрансформации энергии, а также метаболическом взаимодействии между митохондриями и цитозолем клетки, установленные изменения ее активности будут опосредовать изменения метаболических процессов в целом [19].

Следует отметить, что для животных, содержащихся в условиях высокосахарозного рациона, характерно сохранение активности NADH-убихинонредуктазы на уровне контрольных значений (рис. 4). Указанный факт свидетельствует о

том, что в исследуемых экспериментальных условиях, вероятно, пополнение пула NADH будет обеспечиваться реакциями гликолитической оксидоредукции либо окислительного декарбоксилирования пирувата. Можно предположить, что в таких условиях будет накапливаться ацетил-КоА с последующим усилением синтеза триацилглицеролов и накопления жира в гепатоцитах, поскольку усиление липолиза при высокосахарозном рационе отмечено в других исследованиях [20].

В митохондриях клеток печени крыс, получавших высокосахарозный/низкобелковый рацион, наблюдается снижение активности изоцитратдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназы в пять раз (рис. 1 и 3), а активности малатдегидрогеназы – в шесть раз (рис. 2).

Установленные изменения, с одной стороны, могут быть связаны с нарушением структурно-функциональной организации указанных ферментов, а с другой – нарушением их синтеза в условиях алиментарного дефицита протеина. Следствием установленного нами торможения активности NAD^+ -зависимых ферментов цикла Кребса будет не только истощение пула NADH в митохондриях, а и нарушение функционирования электронтранспортной цепи митохондрий. Кроме того, снижение активности NAD^+ -зависимых ферментов цикла Кребса может сопровождаться изменением соотношения $NAD^+/NADH$ с последующим обращением окислительного фосфорилирования и активацией сопряженного с ним гидролиза АТФ. Установленное нами снижение активности NAD^+ -зависимых ферментов указывает на тормо-

жение реакций цикла Кребса, следствием чего будет истощение пула NADH, необходимого для работы дыхательной цепи митохондрий. Изменения каталитических свойств исследуемых энзимов, возможно, вызваны конформационными изменениями их молекул вследствие окислительной модификации. Известно, что интенсификация свободнорадикальных реакций является одним из механизмов нарушения метаболических процессов в условиях избыточного употребления сахарозы [21].

Установленное нами снижение активности митохондриальной NADH-убихинонредуктазы более чем в два с половиной раза (рис. 4) может рассматриваться как одно из звеньев механизма регуляции клеточной энергетики в условиях нарушений сбалансированности рациона сахарозой и пищевым белком.

ВЫВОДЫ

Установлено, что в условиях содержания животных на высокосахарозном рационе в митохондриях клеток печени наблюдается тенденция к снижению активности NAD⁺-зависимых энзимов цикла Кребса при сохранении на уровне контроля показателей активности NADH-убихинонредуктазы, что может рассматриваться как адаптация метаболизма в условиях избыточного поступления сахарозы. В условиях высокосахарозного/низкопротеинового рациона выраженное снижение активности изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и α -кетоглутаратдегидрогеназы сопровождается торможением более чем в два раза активности NADH-убихинонредуктазы, что может рассматриваться как одно из звеньев механизма регуляции клеточной энергетики в условиях нарушения сбалансированности рациона сахарозой и пищевым белком.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки стратегии коррекции метаболических нарушений при разной обеспеченности рациона нутриентами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках НИР «Биохимические и лазерно-поляриметрические параметры комплексного прогнозирования метаболических нарушений», № госрегистрации 0119U100717.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с животными осуществляли с учетом положений Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг. Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Wu, *Food Funct.* **7** (3), 1251 (2016).
2. R. V. Tikole, R. Kulkarni, S. Uppinakudru, et al., *Int. J. Res. Ayurveda and Pharmacy* **4** (4), 605 (2013).
3. J. C. Malta de Oliveira, T. A. Ribeiro, L. P. Tófolo, et al., *J. Endocrin.* **221** (2), 285 (2014).
4. M. Maciejczyk, J. Matczuk, M. Żendzian-Piotrowska, et al., *Nutrients* **10** (10), 1 (2018).
5. A. Pezeshki, R. Zapata, A. Singh, et al., *Sci. Rep.* **6**, 25145₂ (2016).
6. E. F. Mason and J. C. Rathmell, *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (4), 645 (2011).
7. L. Rui, *Compr. Physiol.* **4** (1), 177 (2014).
8. M. G. Radaelli, F. De Cobelli, A. Esposito, et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, 9796175 (2019).
9. S. Satapati, N. E. Sunny, B. Kucejova, et al., *J. Lipid Res.* **53**, 1080 (2012).
10. O. N. Voloshchuk and G. P. Kopylchuk, *Biomed. Khimiya* **62** (2), 169 (2016).
11. F. Fernandes-Lima, L. Monte, F. Nascimento, and B. Gregório, *Tissues Organs* **201** (6), 464 (2016).
12. O. N. Voloshchuk and G. P. Kopylchuk, *Biophysics* **60** (3), 420 (2015).
13. Y.-C. Huang, S. Soundar, and A. F. Colman, *Prot. Sci.* **9**, 104 (2000).
14. P. Cetica, L. Pintos, G. Dalvit, et al., *Reproduction* **126**, 753 (2003).
15. G. Kiss, C. Konrad, J. Doczi, et al., *FASEB J.* **27**, 2392 (2013).
16. I. V. Sharova and N. L. Vekshin, *Biophysics* **49** (5), 814 (2004).
17. R. Vatrinet, G. Leone, M. De Luise, et al., *Cancer & Metabolism* **5**, 3 (2017).
18. M. J. Kumar, D. G. Nicholls, and J. K. Andersen, *J. Biol. Chem.* **278**, 46432 (2003).
19. G. E. Gibson, J. P. Blass, M. F. Beal, and V. Bunik, *Mol. Neurobiol.* **31** (1-3), 43 (2005).
20. S. M. M. Ragab, S. Kh. A. Elghaffar, T. H. El-Metwally, et al., *Lipids in Health and Disease* **14**, 83 (2015).
21. K. Prasad and I. Dhar, *Int. J. Angiol.* **23** (4), 217 (2014).

Peculiarities of Hepatocyte Energy Metabolism when the Nutrient Content in the Chow Diet Varies

O.N. Voloshchuk, G.P. Kopylchuk, and K.A. Tazirova

*Institute of Biology, Chemistry, and Bioresources, Fedkovych Chernivtsi National University,
Chernivtsi, ul. Lesi Ukrainki 25, 58012 Ukraine*

This paper reports a study of the activity of the isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase and malate dehydrogenase and the NADH:ubiquinone reductase in the mitochondrial fraction from the liver tissues of rats fed diets of different sucrose and protein content. Our results show that in animals fed the high-sucrose diet, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities tend to decline and α -ketoglutarate dehydrogenase activity decreases 2.5 times. Interestingly, in animals, fed the high-sucrose diet, NADH:ubiquinone reductase activity remains at the control level. At the same time, in the mitochondrial fraction from the liver tissues of rats fed a low-protein:high-sucrose diet, the enzyme activities of NAD⁺-dependent dehydrogenases of the Krebs cycle decrease considerably more than 2.5 times as compared to control with a simultaneous decline in the activity of NADH:ubiquinone reductase. This is probably one of the links of the mechanism by which energy generated in the cell is regulated when a sucrose:protein ratio in the chow diet is unbalanced. The results obtained can be used to develop a strategy for correction of the metabolic disturbances when the nutrient content in the chow diet varies.

Keywords: isocitrate dehydrogenase, α -ketoglutarate dehydrogenase, malate dehydrogenase, NADH:ubiquinone reductase, liver, nutrients

УДК 577.3

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ В ВОДНОЙ СРЕДЕ С УМЕНЬШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ

© 2020 г. Н.В. Лобышева*, С.В. Нестеров** ***, Ю.А. Скоробогатова*, В.И. Лобышев****

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1/40

**Институт цитохимии и молекулярной фармакологии, 115409, Москва, 6-я Радиальная ул., 24/14

***Московский физико-технический институт, 141701, Долгопрудный Московской обл., Институтский пер., 9

****Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

E-mail: lobyshev@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.01.2020 г.

После доработки 10.01.2020 г.

Принята к публикации 24.01.2020 г.

Исследована эффективность фосфорилирования в образцах изолированных митохондрий печени крыс в инкубационных средах с переменным изотопным составом по дейтерию — 6, 60, 90, 120, 150 ppm, а также 0.1, 1 и 2%. В средах с пониженным содержанием дейтерия (до 60 ppm) наблюдается монотонное снижение коэффициента АДФ/О, а его величина при 6 ppm такая же, как при 60 ppm. Исследована также генерация супероксид аниона комплексами I, II и III дыхательной цепи митохондрий. При всех исследованных режимах функционирования митохондрий с использованием ингибиторов дыхательной цепи генерация супероксид аниона не зависела от концентрации дейтерия в среде инкубации.

Ключевые слова: митохондрии, электрон-транспортный перенос, ингибиторы, супероксид-анион, перекись водорода, фосфорилирование, дейтерий воды, изотопные эффекты.

DOI: 10.31857/S0006302920020131

Давно установлено, что дыхание интактных митохондрий, субмитохондриальных частиц и изолированных комплексов электронного транспорта ингибируется в D₂O [1, 2]. Наиболее сильные изотопные эффекты в концентрированной тяжелой воде, составляющие около 50%, наблюдаются в процессах, связанных с фосфорилированием, т. е. в цитохромном участке. Известно, что природная вода содержит в среднем около 0.015% (или 150 ppm) атомов дейтерия. В природе эта величина варьирует в различных источниках в результате фракционирования изотопов дейтерия при фазовых переходах воды, а также при ее адсорбции. При равновесии в тройной точке воды меньше всего дейтерия будет в паровой фазе и больше всего — в твердой, но эти эффекты относительно малы. Наиболее обедненная дейтерием вода отмечается в осадках Южного полюса, где отношение D/H = 0.0089 ат. % (89 ppm), а наиболее обогащенная — в закрытых бассейнах аридной

зоны, где D/H = 0.0178 ат. % (178 ppm) [3]. Считая, что величина изотопного эффекта в дыхании митохондрий будет линейно зависеть от концентрации дейтерия в водной среде, трудно ожидать значимых эффектов при природных вариациях дейтерия и даже если дейтерий в воде будет полностью отсутствовать. Тем не менее еще в 30-х годах XX века были обнаружены значительные изотопные эффекты в живых организмах в воде, содержащей повышенное содержание дейтерия до 0.06% [4]. Активирующее влияние талой воды из снега на живые организмы, обусловленное пониженной концентрацией дейтерия, было впервые показано в работах [5, 6], где было доказано также, что наблюдаемые эффекты связаны именно с пониженной концентрацией дейтерия. Обзор ранних работ и работ автора на эту тему можно прочитать в [7], более поздних работ в [8]. До сегодняшнего времени адекватное объяснение эффектов, сопровождающих вариации изо-

топного состава воды в области малых концентраций дейтерия, отсутствует. При этом стоит отметить гипотезу «изотопного резонанса», включающую в рассмотрение основные изотопы биомакромолекул — углерод, дейтерий, кислород и азот [9]. По-видимому, невозможно выделить лишь одну органеллу либо какой-либо один процесс, ответственный за наблюдаемые неожиданно большие эффекты в живых организмах при относительно небольшом изменении содержания дейтерия в водной среде, однако митохондрии, являющиеся основным поставщиком энергии в виде АТФ и генератором активных форм кислорода, являются явными претендентами на объяснение наблюдаемых эффектов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали самок крыс линии Wistar массой около 200 г. Использовали митохондрии, выделенные из печени самок крыс по стандартной методике [10]. В течение эксперимента митохондрии хранили в густой суспензии (концентрация белка примерно 150 мг/мл) на льду в пробирках типа «Эппендорф» с небольшим количеством среды промывки (210 мМ маннитола, 40 мМ сахарозы, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, pH 7.4). Среда измерения (320 мОсм, pH 7.4) содержала 285 мМ маннитола, 13 мМ KCl, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂. Стабилизацию температуры 30°C осуществляли с помощью термостата F25 (JULABO GmbH, Германия) с точностью 0.1°C. Скорость дыхания митохондрий измеряли полярографическим методом в ячейке объемом 600 мл с использованием кислородного электрода Кларка (Strathkelvin Mitocell MT200, Oxygen Meter 782; Cole-Parmer, США). В ячейку добавляли 3 мкл суспензии митохондрий. Фосфорилирование измеряли в условиях работы сукцинатдегидрогеназы (комплекса II), в присутствии 0.5 мкМ ротенона и 3 мМ янтарной кислоты в ячейке полярографа. Для запуска фосфорилирования добавляли 160 мкМ АДФ и 250 мкМ фосфата.

Параметр АДФ/О, характеризующий эффективность работы дыхательной цепи, рассчитывали как отношение молярного количества добавленного АДФ к количеству атомарного кислорода, поглощенного суспензией митохондрий за время полного фосфорилирования добавленного АДФ. Максимальное теоретическое значение этого параметра в условиях работы комплекса II равно двум. Более низкое значение АДФ/О в наших экспериментах может быть связано с наличием жирных кислот (природных разобщителей)

в препарате митохондрий, а также использованием невысокой (ниже насыщения ферментов) концентрации фосфата и АДФ, что ограничивало скорость фосфорилирования.

Длительность одной записи полярограммы составляла 8 мин. За это время митохондрии не успевали получить заметных окислительных повреждений, о чем свидетельствовало постоянство скорости дыхания при фосфорилировании в контрольных экспериментах. Сразу после выделения митохондрий начинали снимать первую серию от 6 ppm дейтерия до больших концентраций. После завершения первой серии эксперимента, измерения проводили повторно в том же порядке. Время между записями соответствующих полярограмм первой и второй серий составляло около двух часов. Измерения на митохондриях одной крысы повторялись дважды. Всего было поставлено два эксперимента, т. е. проведено четыре измерения для каждой концентрации дейтерия.

Образование H₂O₂ измеряли с использованием красителя Amplex Red, как описано ранее [11]. К инкубационной среде митохондрий, содержащей 120 мМ KCl, 10 мМ HEPES-трис, 2 мМ K₂HPO₄ при pH 7.4, добавляли 10 мкМ Amplex Red и 5 ед./мл пероксидазы хрена. Интенсивность флуоресценции регистрировали прибором FluoroMax (Horiba Jobin Yvon GmbH, Германия) на длине волны 600 нм при длине волны возбуждения 530 нм. Для калибровки использовали стандартные растворы перекиси водорода. В эксперименте проводили последовательное ингибирование комплексов дыхательной цепи митохондрий: вначале добавляли 1 мкМ ротенона (ингибитор комплекса I), затем добавляли 1 мкМ антимицина (ингибитор N-центра комплекса III дыхательной цепи), затем добавляли 1 мкМ миксотиазола (ингибитор P-центра комплекса III дыхательной цепи).

Для приготовления растворов инкубационной среды использовали воду ОАО «Алмаз» (Москва) с удельной электропроводностью 3.61 мкСм/см, содержащую изотопы дейтерия (D = 4 ppm) и тяжелого кислорода (¹⁸O = 849 ppm и ¹⁷O = 170 ppm). С учетом разбавления суспензии митохондрий исследовали при пониженных концентрациях дейтерия (6, 60, 90 и 120 ppm). Содержание дейтерия в обычной воде принимали за 150 ppm. Повышенное содержание дейтерия обеспечивали добавлением необходимого количества тяжелой воды (D₂O с концентрацией 99.6%) до величин 1000 ppm, 10000 ppm (1%), 20000 ppm (2%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерения фосфорилирования АДФ суспензией митохондрий представлены на рис. 1. Видно, что как уменьшение, так и увеличе-

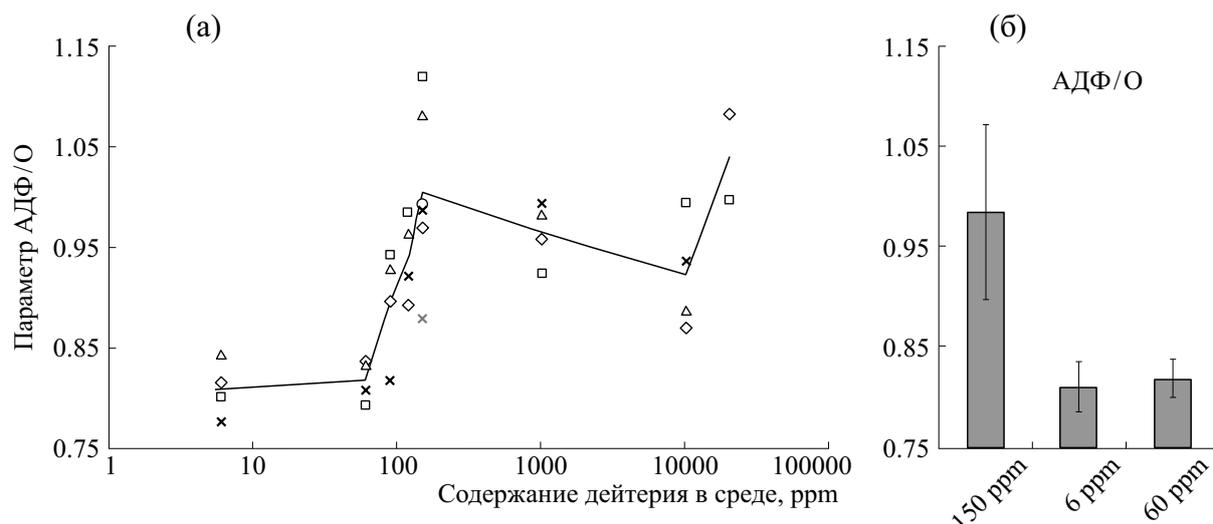


Рис. 1. (а) – Параметр АДФ/О, характеризующий эффективность фосфорилирования. Разными символами обозначены разные серии экспериментов. Линия иллюстрирует зависимость средних значений. (б) – Гистограмма, иллюстрирующая количественное сопоставление экспериментальных данных. Границы погрешностей характеризуют стандартное отклонение ($N = 4$ при 6 и 60 ppm и $N = 6$ при 150ppm). При 6 и 60 ppm отличие от контроля удовлетворяет уровню значимости 0,05, при 10000 ppm – уровню значимости 0,1.

ние содержания в воде относительно его естественного содержания приводит к значимому уменьшению эффективности фосфорилирования. В ряду понижающихся концентраций дейтерия 150–120–90–60 ppm наблюдается монотонное усиление ингибирования. Эффективность фосфорилирования при 6 ppm минимальна и не отличается от таковой при 60 ppm. С увеличением концентрации дейтерия от его природного содержания до 1% эффективность фосфорилирования также уменьшается, но в меньшей степени. При дальнейшем увеличении концентрации дейтерия до 2% наблюдается активация фосфорилирования, достигающая значения в обычной воде. Измерение скорости поглощения кислорода дало среднее значение 22.5 мкмоль O_2 /мин, но большой разброс (связанный со временем, прошедшим после выделения митохондрий) при каждой концентрации дейтерия в образцах не позволил обнаружить наличие изотопных эффектов в среде в интервале использованных концентраций. Различия в параметре АДФ/О на фоне отсутствия достоверных отличий в скорости фосфорилирования и значении дыхательного контроля (соотношение скоростей дыхания при фосфорилировании и в его отсутствие) вызвано тем, что различия в потреблении кислорода в образцах с разной концентрацией дейтерия были существенны в основном при низких концентрациях АДФ, достижимых к концу процесса фосфорилирования.

Необходимо отметить, что измерения эффективности фосфорилирования проводились в условиях невысокой концентрации фосфата и относительно низкой концентрации буфера

HEPES. Ранее было показано, что именно в таких условиях наблюдается формирование фракции неравновесных мембрано-связанных ионов водорода, которая используется для синтеза АТФ [12]. Эта фракция ионов водорода существенно зависит от структурной организации воды у поверхности мембраны, а значит, может быть наиболее чувствительна к изотопному эффекту.

Характерные примеры результатов измерений продукции перекиси водорода в присутствии ингибиторов представлены на рис. 2. В дыхательной цепи митохондрий известны три источника, генерирующие супероксид-анион: комплекс I, продуцирующий супероксид-анион в процессе обратного электронного переноса с комплекса II; Р-центр комплекса III, активно продуцирующий супероксид-анион в случае блокады N-центра Q-цикла; комплекс II, продуцирующий супероксид-анион на флавиновом центре при прямой (с флавина на коэнзим Q) и обратной (с коэнзима Q на флавин) реакциях переноса электрона [13–15]. Экспериментально фиксировали скорость образования перекиси водорода, в которую супероксид анион быстро превращался в митохондриях благодаря работе супероксиддисмутазы. На рис. 2 видно, что скорость генерации не имеет существенных отличий в образцах с различными концентрациями дейтерия в среде: как при генерации супероксид-аниона комплексом I, так и комплексом III (индуцировалось добавление антимицина А – ингибитора N-центра комплекса III). Ингибитор Р-центра комплекса III миксотиазол практически полностью устранял вызванную антимицином А генерацию супероксид-ани-

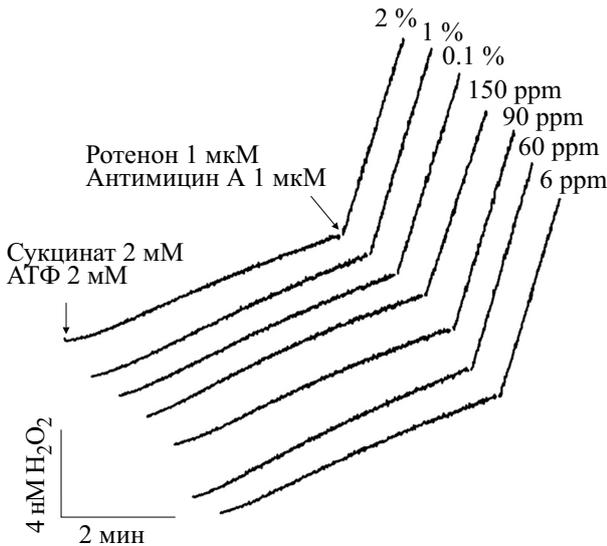


Рис. 2. Продукция H₂O₂ (образующейся из супероксид-аниона) образцами выделенных митохондрий при различных концентрациях дейтерия. Первая часть графиков (около 5 мин) соответствует генерации супероксид-аниона в процессе обратного электронного транспорта на комплексе I. Вторая часть графиков (в присутствии ротенона и антимидина А) соответствует генерации супероксид-аниона комплексом III.

она, однако в этом режиме различий в генерации супероксид-аниона между средами с разными концентрациями дейтерия также не наблюдалось (данные не приведены). Помимо этого ингибиторный анализ был проведен при работе комплекса II при низких концентрациях сукцината (100 мкМ) в присутствии ротенона (ингибитора, эффективно блокирующего реакцию как прямого, так и обратного переноса электронов в комплексе I). В условиях неполного насыщения комплекса II скорость синтеза супероксид-аниона была выше, чем при 2 мМ сукцината, однако отличий между образцами с различной концентрацией дейтерия также не наблюдалось (данные не приведены). Полученные результаты по измерению скорости синтеза супероксид-аниона в образцах изолированных митохондрий полностью согласуются с литературой, однако в средах измерения с изотопным составом среды 6, 60, 90, 120, 150 ppm, а также 0.1 и 1%, генерация перекиси водорода оказалась одинаковой с высокой точностью (расхождение не более наблюдаемого между контрольными экспериментами). Таким образом, можно заключить, что в условиях эксперимента изменение концентрации дейтерия не оказывало влияния на продукцию супероксид-аниона комплексами I, II и III дыхательной цепи.

Полученные результаты по генерации перекиси водорода отличаются от опубликованных ранее [16], где была показана примерно двукратная

активация максимальной скорости генерации H₂O₂ изолированными митохондриями печени крыс при использовании воды с содержанием дейтерия 52 ppm без использования ингибиторов дыхательной цепи. Следует отметить, что наши эксперименты (рис. 2) проводились в условиях окисления сукцината и наличия АТФ, что гарантировало высокий мембранный потенциал, служащий важным фактором генерации АФК, в особенности при реакции обратного переноса электронов с комплекса II на комплекс I. Однако в опытах, в которых ротенон присутствовал с самого начала эксперимента, нам также не удалось увидеть изотопных эффектов. Сравнение полученных в настоящей работе и литературных результатов дает возможность предположить, что изотопный эффект дейтерия в генерации перекиси водорода может проявляться в условиях прямого электронного переноса на комплексе I (с NADH на убихинон), однако это предположение требует дополнительной проверки. Стоит отметить, что кроме комплексов дыхательной цепи источником супероксид-аниона в митохондриях могут выступать некоторые ферменты цикла Кребса. Нельзя исключать влияния дейтерия на их функционирование.

Известна еще одна работа [16], в которой опытной группе крыс предоставляли для питья воду с содержанием дейтерия 46 ppm в течение 28 суток и затем анализировали продукцию перекиси водорода изолированными митохондриями в среде с нормальным содержанием дейтерия и пониженным до 46 ppm. Было показано, что митохондрии печени крыс, адаптированных к облегченной по дейтерию воде, в этой же воде продуцируют на 35% большее количество H₂O₂, чем митохондрии крыс, выросших в нормальных условиях и тестируемых в обычной воде. Качественно этот эффект наблюдается как с добавлением сукцината, так и без добавления субстрата за счет внутренних метаболитов. Важным результатом, на который авторы не обратили должного внимания, является то, что митохондрии печени крыс, адаптированные к облегченной воде, но тестируемые в обычной воде, показали такие же результаты, как и в контроле. Это означает, что изотопные эффекты облегченной воды обусловлены действием воды как растворителя и не затрагивают существенно системы живой клетки в процессе долговременной адаптации животных к воде с облегченным изотопным составом. Этот результат косвенно подтверждается недавней работой [18], в которой новейшими методами «окс-ред протеомики» (Ox-Red Proteomics) при анализе 2935 белков выявлена роль митохондриальных белков в изменении окислительно-восстановительного статуса клеточных культур при помеще-

нии их в среду с облегченным изотопным составом по дейтерию.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Часть работы (измерение дыхания митохондрий) выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-04-00835\19.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Л.С. Ягужинского за полезные обсуждения.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проведенные процедуры по содержанию и использованию животных соответствовали стандартам Международной ассоциации по оценке и аккредитации работ с лабораторными животными (AAALAC).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. A. Margolis, H. Baum, and G. Lenaz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25** (1), 133 (1966).
2. В. И. Лобышев и Л. П. Калиниченко, *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах* (Наука, М., 1978).
3. В. И. Ферронский и В. А. Поляков, *Изотопия гидросферы Земли* (Изд-во «Научный мир», М., 2009).
4. T. C. Barnes, *Science* **79** (2050), 370 (1934).
5. Б. Н. Родимов, *Сельское хоз-во Сибири*, № 76, 66 (1961).
6. И. В. Торопцев, Б. Н. Родимов, А. М. Маршунина и др., в сб. *Вопросы радиобиологии и гематологии* (Изд-во Томского ун-та, Томск, 1966), сс. 118–126.
7. В. И. Лобышев, *Актуальные вопросы биологической физики и химии* **3** (3), 511 (2018).
8. A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev, and S. Dzhimak, *Nutrients* **11**, 1903 (2019).
9. X. Xie and R. A. Zubarev, *Sci. Rep.* **5**, 9215 (2015).
10. D. Johnson and H. Lardy, in *Methods in Enzymology*, ed. by R. W. Estbrook and M. E. Pullman (N.-Y., Acad. Press, 1967), v. 10, pp. 94–96.
11. A. A. Selin, N. V. Lobysheva, O. N. Vorontsova, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **153** (1), 44 (2012).
12. С. А. Еремеев и Л. С. Ягужинский, *Биохимия* **80** (5), 682 (2015).
13. M. D. Brand, *Exp. Gerontol.* **45**, 466 (2010).
14. F. L. Muller, Y. Liu, H. Van Remmen, *J. Biol. Chem.* **279**, 49064 (2004).
15. C. L. Quinlan, A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, et al., *J. Biol. Chem.* **287**, 27255 (2012).
16. И. А. Помыткин и О. Е. Колесова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **142** (11), 514 (2006).
17. С. С. Джимаков, А. А. Басов, Н. Н. Волченко и др., *Докл. РАН* **476** (5), 584 (2017).
18. X. Zhang, M. Gaetani, A. Chernobrovkin, and R. A. Zubarev, *Mol. Cell. Proteomics* **18** (12), 2373 (2019).

Functional Activity of Mitochondria in Deuterium Depleted Water

N.V. Lobysheva*, S.V. Nesterov**, ***, Yu.A. Skorobogatova*, and V.I. Lobyshev****

*Belozersky Research Institute for Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/40, Moscow, 119992 Russia

**Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, 6-ya Radialnaya ul. 24/14, Moscow, 115409 Russia

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

****Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

The efficiency of phosphorylation in samples of isolated rat liver mitochondria in isotopically different incubation media at deuterium content of 6, 60, 90, 120, 150 ppm, and 0.1, 1, and 2% was studied. In environments with the lowest deuterium content down to 60 ppm, there was a monotonic decline in the ADP/O ratio, and its value at 6 ppm was equivalent to that seen at 60 ppm. The generation of superoxide anion by complexes I, II and III of the mitochondrial respiratory transport chain was also investigated. In all studied modes of mitochondrial operation using electron chain inhibitors the generation of superoxide anion did not depend on the deuterium concentration in the incubation medium.

Keywords: mitochondria, electron transport, inhibitors, superoxide anion, hydrogen peroxide, phosphorylation, water deuterium, isotopic effects

ИССЛЕДОВАНИЕ МАКРОФАГАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В МНОГОКЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТАХ

© 2020 г. М.И. Кобякова*, Я.В. Евстратова*, А.С. Сенотов*, А.И. Ломовский*,
В.В. Новикова*, К.С. Краснов**, И.С. Фадеева*, В.С. Акатов*, Р.С. Фадеев*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской обл., Институтская ул., 3

**Тульский государственный университет, 300012, Тула, просп. Ленина, 92

E-mail: ritaaaaa49@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 29.11.2019 г.

Принята к публикации 31.01.2020 г.

Главной причиной недостаточной эффективности терапии острого миелоидного лейкоза является возникновение устойчивости лейкозными клетками к действию химиотерапевтических препаратов. Факторы микроокружения играют одну из ключевых ролей в формировании фенотипа лекарственной устойчивости лейкозных клеток. Выяснение механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения, важно для идентификации новых фармакологических мишеней консервативной терапии направленного действия. Нами было проведено исследование роли дифференцировки в макрофагальном направлении в повышении лекарственной устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах. Показано, что в многоклеточных агрегатах не происходит созревания в макрофагальном направлении. Эти данные указывают на участие других механизмов в повышении лекарственной устойчивости в многоклеточных агрегатах клеток острого миелоидного лейкоза.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, лекарственная устойчивость, многоклеточные агрегаты, межклеточная адгезия, дифференцировка.

DOI: 10.31857/S0006302920020143

Острый миелоидный лейкоз — злокачественная опухоль гемопоэтической системы, которая характеризуется накоплением аномальных (лейкозных) бластных клеток, главным образом, в костном мозге и нарушением нормального гемопоэза и иммунитета [1]. Эффективность консервативной терапии острого миелоидного лейкоза колеблется от 20 до 45% [2]. Одной из основных причин недостаточной эффективности терапии острых форм миелоидного лейкоза является возникновение первичной лекарственной устойчивости у лейкозных клеток. Главной причиной возникновения данного типа устойчивости считается взаимодействие клеток лейкоза с элементами их микроокружения в патологически измененном костном мозге, например, с мезенхимальными стромальными клетками или внеклеточным матриксом [3, 4]. Ранее нами было

обнаружено [5, 6], что не только контакты с элементами стромы костного мозга могут способствовать формированию первичной лекарственной устойчивости у лейкозных клеток; контакты только между лейкозными клетками (гомотипические взаимодействия), которые возникают при образовании многоклеточных агрегатов, также могут приводить к выраженному повышению устойчивости к индукции клеточной гибели. Выяснение механизмов лекарственной устойчивости, опосредованной условиями микроокружения, важно для выявления новых фармакологических мишеней консервативной терапии направленного действия. Одной из возможных причин повышения лекарственной устойчивости в многоклеточных агрегатах может являться созревание (дифференцировка) клеток острого миелоидного лейкоза в макрофагальном направлении [7–9]. Так, повышение лекарственной устойчивости при созревании в макрофагальном направлении может быть связано с увеличением экспрессии антиапоптотического белка FLIP, ко-

Сокращения: CD — кластеры дифференцировки, ЛПС — липополисахарид, ФНО — фактор некроза опухоли, ИЛ — интерлейкин.

торый является ингибитором активации каспазы 8, увеличением экспрессии антиапоптотического белка XIAP, а также с активацией транскрипционного фактора NF- κ B и PI3K/Akt сигнального каскада [10–12].

В связи с этим в данном исследовании нами было проведено изучение степени созревания (дифференцировки) в макрофагальном направлении клеток острого миелоидного лейкоза в многоклеточных агрегатах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования в работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека ТНР-1, полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640/F12 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, 80 мкг/мл гентамицина, 24 мкг/мл флуконазола при 37°C в условиях 5%-го содержания CO₂ в воздухе.

Для формирования многоклеточных агрегатов клетки высевали по 5 · 10³ клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды в 96-луночные планшеты, покрытые 1.5%-м раствором агарозы (Panreas, Испания) и культивировали в течение пяти суток (120 ч). В контрольных условиях клетки ТНР-1 высевали по 5 · 10³ клеток в лунку в 100 мкл полной ростовой среды в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. Через 24 ч культивирования многоклеточные агрегаты отсутствовали.

Макрофагоподобные клетки получали с помощью обработки форболовым эфиром форбол-12-миристан-13-ацетатом, известным индуктором макрофагальной дифференцировки. Для этого клетки ТНР-1 культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки в присутствии 200 нМ форбол-12-миристан-13-ацетата (Sigma, США) в течение 96 ч. Затем клетки трижды отмывали средой DMEM/F12 и использовали для экспериментов. Для открепления клеток от поверхности культуральных флаконов использовали Accutase (Sigma, США).

Имунофенотипирование клеток. Для исследования экспрессии моноцитарно-макрофагальных маркеров (кластеров дифференцировки – CD) на поверхности клеток ТНР-1 через 24 и 120 ч инкубации клетки собирали с 96-луночных планшетов, отмывали в Cell Staining Buffer (Biolegend, США), при 300 g в течение 5 мин. Окрашивание проводили с использованием панели моноклональных антител APC Anti-human CD11b (Biolegend, США), FITC Anti-human CD14 (Sigma, США), FITC Anti-human PTPRC (Sigma,

США), FITC Mouse Anti-Human CD163 (BD Bioscience, США), FITC Anti-Human CD68 (BD Bioscience, США), контрольные клетки окрашивали APC Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США) или FITC Mouse IgG1, k isotype Ctrl (Biolegend, США) соответственно. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После окрашивания клетки фиксировали 2%-м раствором параформальдегида (Panreas, Испания). Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США).

Оценка относительного количества митохондрий и лизосом. Для оценки относительного количества митохондрий и лизосом у клеток ТНР-1 после 24 и 120 ч культивирования клетки окрашивали 100 нМ MitoTracker Green FM (Thermo Fisher Scientific, Германия) и 75 нМ LysoTracker Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific, Германия) соответственно. Инкубировали в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора. Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Анализ фагоцитарной активности клеток. Для определения фагоцитарной активности клеток ТНР-1 после 24 и 120 ч культивирования к клеткам добавляли 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* (Thermo Fisher Scientific, Германия), инкубировали в течение 2 ч в условиях CO₂-инкубатора. В качестве контроля неспецифического окрашивания клетки инкубировали с 10 мкг/мл цитохалазина Д (Sigma, США), в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора, затем добавляли 1 мг/мл pHrodo Green *E. coli* и инкубировали в течение 2 ч. Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Оценка внутриклеточной продукции NO. Для оценки внутриклеточной продукции NO после 24 и 120 ч культивирования клетки окрашивали 5 мкМ DAF-FM DA (Thermo Fisher Scientific, Германия), инкубировали в течение 40 мин в условиях CO₂-инкубатора. Далее клетки отмывали в полной ростовой среде (300 g, 5 мин) и инкубировали в ней в течение 30 мин в условиях CO₂-инкубатора. Для определения индуцибельной продукции NO клетки прединкубировали с 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) в течение 24 ч. Определение проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Анализ индуцированной липополисахаридами секреции цитокинов. Для определения ЛПС-индуцированной секреции фактора некроза опухоли (ФНО- α), интерлейкинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 клетками ТНР-1, клетки инкубировали с 10 мкг/мл ЛПС из *E. coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 ч. После инкубации клетки собирали с 96-луночных планшетов, центрифугировали (300 g, 5 мин), для

Анализ экспрессии моноцитарно-макрофагальных маркеров у клеток ТНР-1

Маркеры	Интегрин альфа-М (CD11b)	Корцептор для ЛПС (CD14)	PTPRC (CD45)	Макросиалин (CD68)	Рецептор для гаптоглобина (CD163)
Контроль	—	—	96.0 ± 3.0%	71.0 ± 3.0%	—
Многочлечный агрегат	24.0 ± 1.0%	—	97.0 ± 1.0%	97.0 ± 1.0%	—
Клетки, обработанные форбол-12-миристан-13-ацетатом	7.1 ± 0.1%	95.1 ± 0.3%	99.0 ± 0.4%	6.0 ± 2.0%	—

анализа использовали надосадочную жидкость. Оценку секреции ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 проводили с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа «Интерлейкин-1бета-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ» и «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» («Вектор Бест», Россия) согласно указаниям производителя. Оптическую плотность определяли при длине волны 450 нм, используя планшетный ридер Imark (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Опыты проводили не менее чем в трех повторениях ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием дисперсионного анализа (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки созревания клеток ТНР-1 в макрофагальном направлении проводили анализ экспрессии клеточных маркеров CD11b, CD14, CD45, CD68, CD163; оценивали относительное количество митохондрий, лизосом и продукцию внутриклеточного оксида азота (NO); определяли фагоцитарную активность, а также ЛПС-индуцированную секрецию ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6. Сравнение проводили относительно клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (форбол-12-миристан-13-ацетатом).

Показано, что для клеток ТНР-1 характерна конститутивная экспрессия РТПРС (CD45) и макросиалина (CD68). В то же время в многочисленных агрегатах появлялось $24 \pm 1\%$ интегрин альфа-М (CD11b)-положительных клеток и число макросиалин (CD68)-клеток составляло $97 \pm 1\%$, что достоверно отличается от контроля ($P \leq 0.001$) (таблица). Для клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром, характерна экспрессия практически у всех клеток корцептора для ЛПС (CD14) и практически полное отсутствие клеток, несущих маркер CD68.

При оценке ЛПС-индуцированной секреции ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α для клеток в многочис-

точных агрегатах выявлено достоверное ($P < 0.05$) увеличение ИЛ-1 β (рис. 1а), но не ИЛ-6 (рис. 1б) и ФНО- α (рис. 1в) относительно контрольных клеток. У клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром, показана высокая ЛПС-индуцированная секреция всех представленных цитокинов (рис. 1).

Также было показано, что у клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах происходит повышение ЛПС-индуцированной продукции внутриклеточного оксида азота, что не характерно для клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 2).

Далее мы показали, что у клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах относительное количество митохондрий достоверно выше (рис. 3а), чем у клеток ТНР-1 в контроле ($P \leq 0.005$) и у клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром ($P < 0.05$). В то же время относительное количество лизосом у клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах не отличалось от относительного количества лизосом у контрольных клеток и было меньше, чем у клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 3б).

Также было проведено исследование фагоцитарной активности клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах. Было показано, что относительное фагоцитарное число клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах не отличалось от фагоцитарного числа клеток в контроле и было ниже, чем у клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 4а). Однако фагоцитарный индекс клеток ТНР-1 в многочисленных агрегатах не отличался от фагоцитарного индекса клеток в контроле и клеток ТНР-1, обработанных форболовым эфиром (рис. 4б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было показано, что в многочисленных агрегатах, образованных клетками ТНР-1, наблюдается появление альфа-М-интегрин (CD11b)-положительных клеток и увеличивается число макросиалин (CD68)-положительных кле-

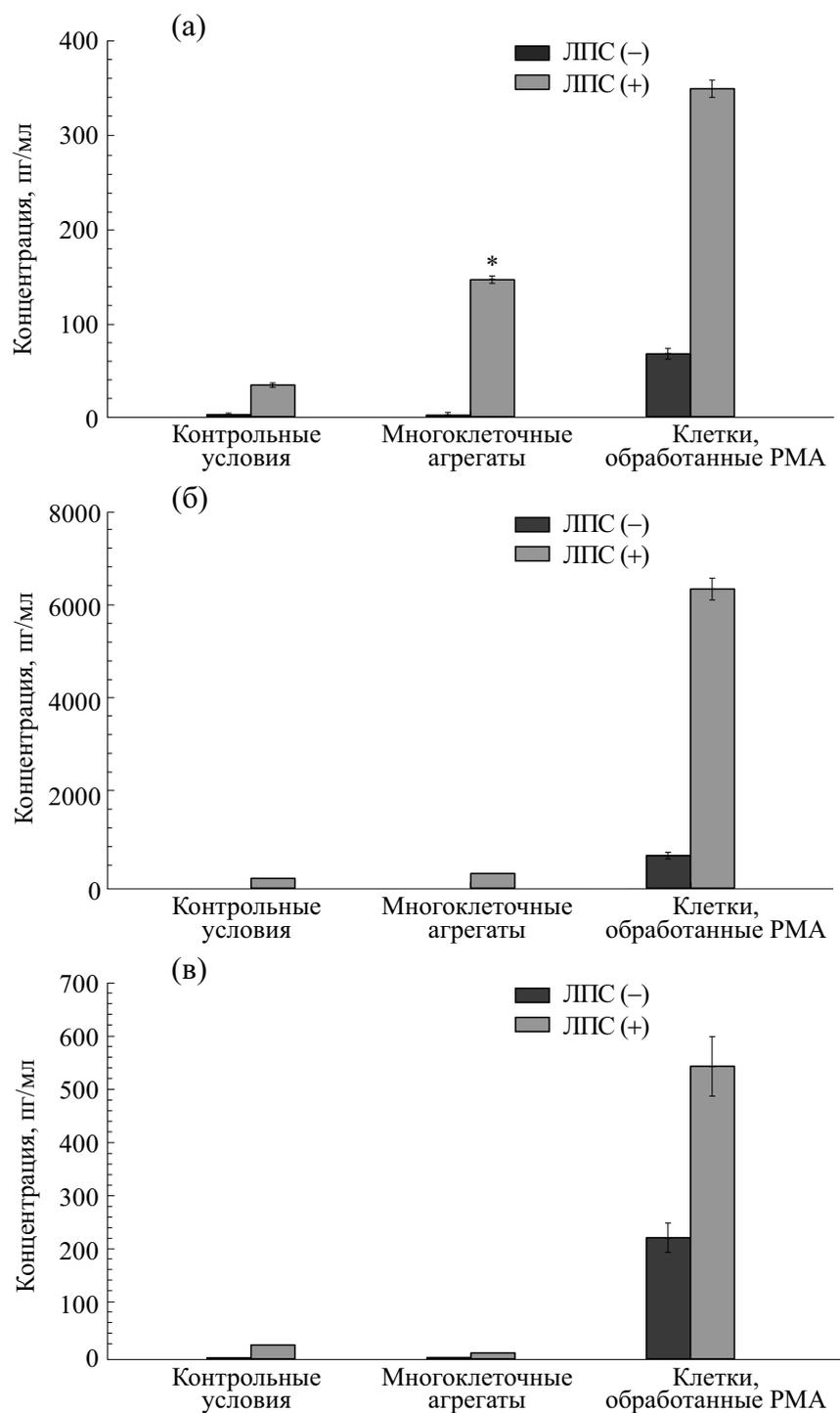


Рис. 1. ЛПС-индуцированная секреция ИЛ-1 β (а), ИЛ-6 (б) и ФНО- α (в) клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах.

ток, отсутствие ЛПС-индуцированной секреции ИЛ-6 и ФНО- α , увеличение ЛПС-индуцированной продукции внутриклеточного оксида азота, увеличение относительного количества митохондрий, что не характерно для клеток ТНР-1, обра-

ботанных форболовым эфиром, стандартным агентом макрофагальной дифференцировки.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что у клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах не происходит созревания в макрофагальном на-

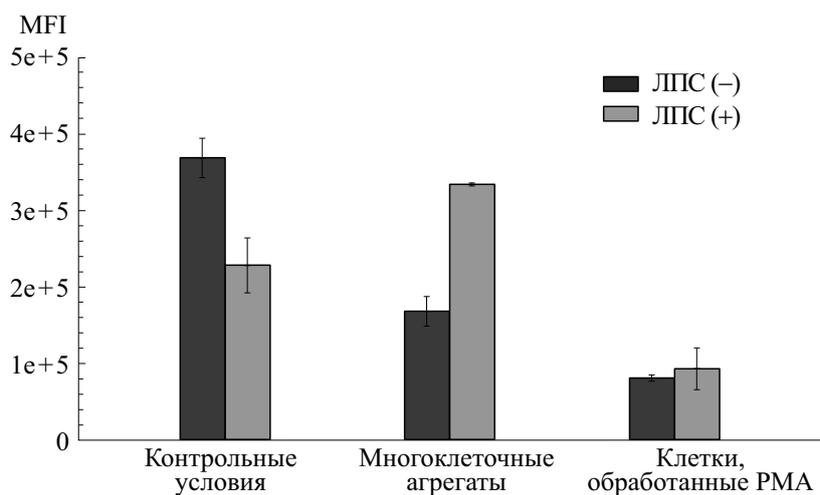


Рис. 2. Продукция внутриклеточного NO клетками ТНР-1 в многоклеточных агрегатах.

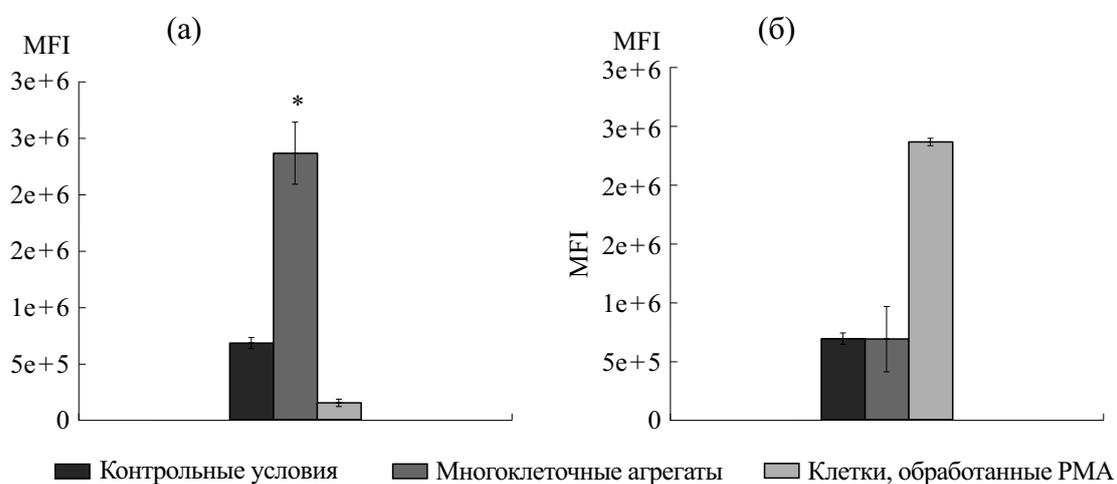


Рис. 3. Относительное количество митохондрий (а) и лизосом (б) у клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах.

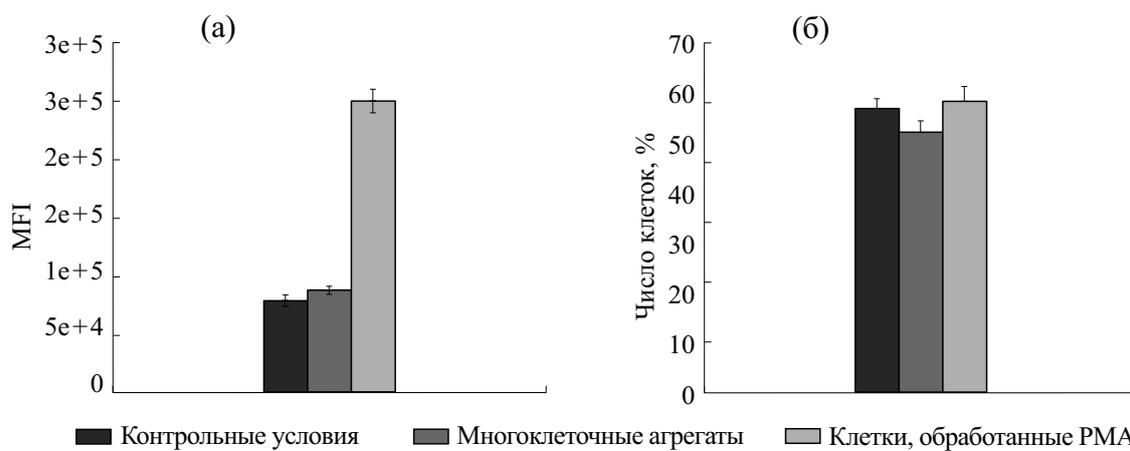


Рис. 4. Фагоцитарная активность клеток ТНР-1 в многоклеточных агрегатах: относительное фагоцитарное число (а) и фагоцитарный индекс (б).

правлении и повышение лекарственной устойчивости связано с другими механизмами.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Hoffman, B. Furie, P. McGlave, et al., *Hematology: Basic Principles and Practice*, 4th ed. (Churchill Livingstone Elsevier., 2005).
2. G. Marcucci, T. Haferlach, and H. Döhner, *Clin. Oncol. J.* **29** (5), 475 (2011).
3. S. Maier, C. Dahlstroem, C. Haefliger, and A. Plum, *Am. Pharmacogenom. J.* **5**, 223 (2005).
4. S. T. Taylor, J. A. Hickman, and C. Dive, *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 18 (2000).
5. С. Г. Захаров, А. К. Голенков, Т. А. Митина и др., *Альманах клин. медицины* **31**, 11 (2014).
6. Р. С. Фадеев, М. Е. Соловьева, Д. А. Слядовский и др., *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии* **32** (2), 125 (2015).
7. Я. В. Евстратова, М. И. Кобякова, В. В. Новикова и др., *Биофизика* **64** (5), 729 (2019).
8. T. Oda, K. Hirota, K. Nishi, and R. Nohara, *Am. Physiol. Cell Physiol. J.* **291** (1), 104 (2006).
9. M. Daigneault, J. A. Preston, H. M. Marriott, et al., *PLoS One* **5** (1), e8668 (2010).
10. L. J. Pagliari, H. Perlman, H. Liu, and R. M. Pope, *Mol. Cell. Biol.* **20**, 8855 (2000).
11. Y. Ma, V. Temkin, H. Liu, R. M. Pope, *J. Biol. Chem.* **280** (51), 41827 (2005).
12. H. Liu, H. Perlman, L. J. Pagliari, and R. M. Pope, *J. Exp. Med.* **194**, 113 (2001).

The Study of Macrophage Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells in Multicellular Aggregates

M.I. Kobyakova*, Ya.V. Evstratova*, A.S. Senotov*, A.I. Lomovsky*, V.V. Novikova*, K.S. Krasnov**, I.S. Fadeeva*, V.S. Akatov*, and R.S. Fadeev*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Tula State University, prosp. Lenina 92, Tula, 300012 Russia*

The main reason of insufficient efficacy in treatment of acute myeloid leukemia is the emergence of leukemic cells resistant to the action of chemotherapeutic drugs. Microenvironment factors play one of the key roles in the formation of the phenotype of drug resistance of leukemia cells. Elucidating mechanisms of drug resistance mediated by microenvironment conditions is important in order to identify new pharmacological targets for conservative directed therapy. We have studied the role of differentiation in the macrophage direction in increasing the drug resistance of acute myeloid leukemia cells in multicellular aggregates. It was shown that in multicellular aggregates no maturation occurs in the macrophage direction. These data indicate that other mechanisms contribute to an increased drug resistance in multicellular aggregates of acute myeloid leukemia cells.

Keywords: acute myeloid leukemia, drug resistance, multicellular aggregates, intercellular adhesion, differentiation

СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА РАСТЕНИЙ ВОДНЫМ РАСТВОРОМ, АКТИВИРОВАННЫМ ПЛАЗМОЙ ТЛЕЮЩЕГО РАЗРЯДА

© 2020 г. С.В. Белов*, Л.М. Апашева**, Ю.К. Данилейко*, А.Б. Егоров*, А.В. Лобанов**, В.И. Луканин*, Е.Н. Овчаренко*, В.В. Савранский*, Л.Г. Шилин*

*Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

**Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: ser79841825@yandex

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 10.12.2019 г.

Принята к публикации 25.12.2019 г.

Представлены результаты применения водных, слабо концентрированных растворов сильных электролитов, активированных плазмой тлеющего разряда, для стимуляции роста растений. Получено экспериментальное подтверждение возможности использования подобных растворов в качестве эффективного регулятора роста растений.

Ключевые слова: плазма, активация, растения, регулятора роста, пероксид водорода, водный раствор.

DOI: 10.31857/S0006302920020155

Земли России, пригодные для возделывания сельскохозяйственных культур, в большей части относятся к зонам рискованного земледелия. Остается актуальным поиск и создание антистрессовых регуляторов роста с определенными свойствами, нужными для использования их в практике сельского хозяйства, а именно: экологическая безопасность, растворимость в воде, малые количества для достижения нужного эффекта, невысокая стоимость, возможность получения препарата на месте его применения [1–3].

Таковыми свойствами обладают водные растворы пероксида водорода. Об уникальной роли пероксида водорода в процессе фотосинтеза, синтеза крахмала и хлорофилла, о его свойстве регулировать рост и развитие растений сообщалось в работах [1, 4, 5]. Было показано и защищено рядом патентов, что допосевная обработка семян и внекорневая обработка зеленых растений растворами пероксида водорода в определенных концентрациях, повышают устойчивость и сохранность сельскохозяйственных растений в жестких условиях дефицита влаги, заморозков, засоления грунтов [4–7].

Целью данной работы является экспериментальная оценка влияния водных растворов, активированных высокочастотной плазмой тлеющего разряда, на скорость прорастания семян сельскохозяйственных растений.

Сокращение: АПВ – активированный плазмой водный раствор.

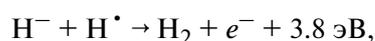
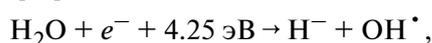
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение эффективных регуляторов роста, содержащих пероксид водорода, возможно с помощью воздействия на слабоконцентрированные водные растворы сильных электролитов низкотемпературной плазмой тлеющего разряда в водяных парах при атмосферном давлении [8, 9]. В нашем случае в качестве электролита использовали водный раствор K_2SO_4 в концентрации $5.7 \cdot 10^{-2}$ М либо водный раствор $NaCl$ в концентрации 0.17 М. Горение плазмы в объеме водного раствора (электролита) осуществляли при помощи платинового активного электрода толщиной 0.3 мм и длиной 15 мм, погруженного в раствор. В качестве второго (нейтрального) электрода использовали графитовую пластину размером 20×60 мм², также погруженную в емкость с раствором. Активный и нейтральный электроды подключали к высокочастотному генератору, работающему на частоте 110 кГц при амплитудном значении напряжения до 300 В [10]. Уровень мощности, подводимой к активному электроду, выбирали из условия образования на его поверхности парогазового слоя, полностью покрывающего электрод. В результате возникновения высокоомного парогазового слоя падение напряжения происходит на этом слое, что приводит к возникновению в его объеме высокочастотного плазменного разряда тлеющего типа [8, 10]. Плазмообразующим газом в данном случае является водяной пар. Для выбранной концентрации электролита и размеров

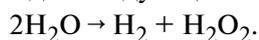
Таблица 1. Зависимость концентрации пероксида водорода от времени хранения АПВ

Число суток	3	5	7	9
Концентрация пероксида водорода, М	$6 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$

активного электрода мощность, обеспечивающая поджиг и горение плазмы, составляла около 150 Вт. В результате горения плазмы в водяном паре протекают плазмохимические реакции, среди которых основными являются реакции разложения воды по механизму диссоциативного прилипания [11]:



где М – молекула (ион) в газовой подсистеме плазмы. Как видно из приведенных выше реакций, пероксид водорода образуется в результате гетерогенной рекомбинации радикалов OH^\bullet с участием молекулы (иона) М [10]. При этом на одну молекулу выделившегося водорода синтезируется одна молекула пероксида водорода. Общее уравнение выглядит следующим образом:



Здесь пероксид водорода H_2O_2 является основным устойчивым окислителем, генерируемым в водном электролите под действием плазмы тлеющего разряда в парах воды и находящейся в контакте с раствором. Заметим, что использование проводящего ток электролита обусловлено необходимостью замыкания электрической цепи, состоящей из генератора высокочастотного тока, активного металлического электрода, плазмы тлеющего разряда, жидкостного электролитного электрода и нейтрального электрода. Кроме пероксида водорода в водном растворе под действием высокочастотной плазмы могут образовываться и другие активные компоненты, такие как водород и активный кислород [12], появляющиеся вследствие полного разложения молекул воды, а также ионы металлов, образующиеся в процессе электрохимической эрозии электродов.

Эмиссионный спектр излучения плазмы исследовался с помощью спектрофотометра FSD-10 (ООО «Научно технический центр волоконно-оптических устройств», Москва, Россия) с волоконнооптическим вводом излучения и регулируемым временем накопления спектра. При этом наблюдение велось на сильных линиях излучения водорода (656 нм), натрия (589 нм), калия (768 нм), а также полосы гидроксидов (306 нм). Наличие линий атома водорода и радикала OH^\bullet указывает на молекулярный распад воды на ак-

тивные составляющие, чем и обусловлена высокая химическая активность плазмы.

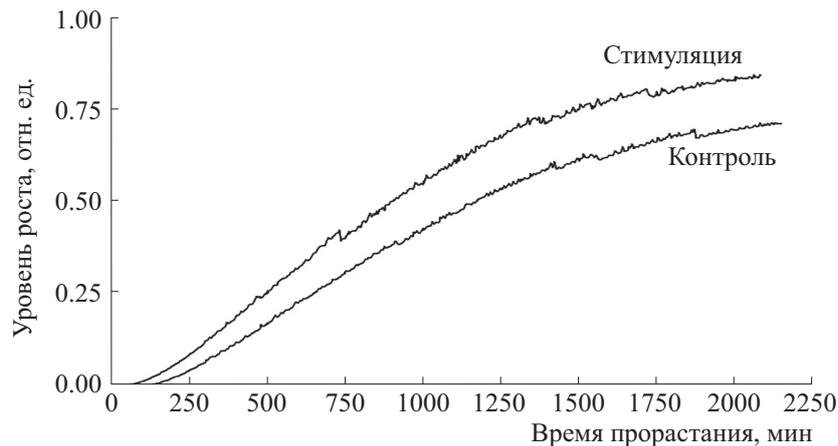
Известно, что активированный плазмой водный раствор (далее АПВ), содержащий пероксид водорода, влияет на метаболизм растительных систем, ускоряя фотосинтез и регулируя процессы роста и развития растений [12]. Избыток H_2O_2 может вызвать окислительный стресс, повреждающий растительную клетку и тем самым ингибирующий процессы роста. В данной работе концентрацию пероксида водорода в растворе АПВ измеряли йодометрическим способом [13, 14], она составляла порядка $5 \cdot 10^{-4}$ М. Кислотность получаемой АПВ составляла 5.8–6.6 и оценивалась с помощью портативного рН-метра Testo 205 (Testo SE & Co. KGaA, Германия). Заметим, что пероксид водорода является основным претендентом на объяснение эффекта стимуляции роста растений [12], вследствие чего наличие других компонентов, появляющихся в результате плазменной активации воды, в данной работе не анализировалось. Исходя из этого, концентрацию пероксида водорода рассматривали как маркер степени разведения исходной АПВ при оценке стимуляции роста растений. Оценка стабильности раствора АПВ по концентрации пероксида водорода при его хранении в темном помещении и температуре 20°C показывает, что АПВ остается достаточно стабильным в течение девяти суток. Зависимость концентрации пероксида водорода от времени хранения АПВ представлена в табл. 1.

Изучение действия АПВ на рост растений для подтверждения возможности его универсального использования в практике сельского хозяйства проводили на значимых сельскохозяйственных культурах, принадлежащих к разным семействам.

Тест-объектами были выбраны следующие растения: сорго Черное (семейство злаковых), редис сорта «18 дней» (семейство крестоцветных), сафлор сорта «Заволжский» (семейство астровых), клубневые черенки картофеля (семейство пасленовых), огурцы сортов «Конкурент» и «Дальневосточный» с пониженной всхожестью (семейство тыквенных).

Эффективность воздействия растворов АПВ на рост растений оценивали на ранних стадиях их роста при помощи ряда морфологических тестов. При этом учитывали:

1. Количество проросших семян (проросшими считали семена с длиной корня 1–2 мм).



Динамика увеличения суммарной площади корневой системы в контроле и в опыте с использованием АПВ.

2. Срок перехода и количество растений к очередной фазе развития — первый сформированный лист.

3. Развитие корневой системы.

4. Количество жизнеспособных растений.

В качестве контрольных брали растения, обработанные водой или растворами коммерческой перекиси водорода. Опытными образцами служили растения, обработанные растворами АПВ. Сравнение эффективности действия растворов коммерческой перекиси водорода и АПВ проводили на растворах с одинаковой концентрацией пероксида водорода. Семена замачивали в чашках Петри, помещали в термостат при 20°C и каждые 12 ч отмечали количество проросших семян. Проросшие семена высевали в культуральные сосуды с песком, увлажненным опытным или контрольным растворами. Сосуды помещали в люминистат с ритмом освещения свет/темнота 12/12 ч. На седьмые сутки опыта измеряли высоту растений, развитие корневой системы, количество сформировавшихся растений.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пример 1. С целью установления влияния активации водного раствора АПВ на основе K_2SO_4 на ростовые процессы растений были проведены эксперименты по проращиванию семян сорго. Для измерения скорости прорастания исходные семена делили на две группы и замачивали в течение двух часов в водном растворе K_2SO_4 с концентрацией $5.7 \cdot 10^{-2}$ М. В одной группе раствор K_2SO_4 не подвергался воздействию плазмы, а в другой — проходил плазменную активацию с образованием пероксида водорода с концентрацией $1 \cdot 10^{-6}$ М. Из каждой группы семян случайным образом делали выборку объемом 100 семян. Ото-

бранные семена раскладывали в квадратную чашку Петри, состоящую из 100 ячеек (одно семя на ячейку). Грунт для посадки состоял из слоя промытого песка толщиной порядка 5 мм. Грунт в двух контейнерах смачивали обычным и активированным раствором соответственно. Для ограничения роста корешка в вертикальной плоскости семена дополнительно прижимали покровным стеклом толщиной 3 мм. С помощью цифровой камеры, расположенной перпендикулярно плоскости чашки с семенами, каждые 20 мин делали снимок. Дальнейшая обработка фотографий в среде MathCad позволяла определить эффективную суммарную длину корешков. Динамика увеличения суммарной длины корневой системы для контрольного посева и посева с использованием АПВ, усредненная по количеству проросших семян, приведена на рисунке.

Расчет скорости нарастания корневой массы на начальной стадии показывает, что для семян, прошедших активацию, скорость прорастания на 30% выше, чем для контроля.

Пример 2. Специально отобранные семена огурца (сорт «Дальневосточный» с пониженной всхожестью) проращивали в растворах АПВ, коммерческой перекиси водорода и в воде. На третьи сутки (оптимальный срок для культуры огурца) проводили учет количества проросших семян. Наибольший эффект (95% проросших семян) наблюдали при стимуляции семян раствором АПВ с концентрацией пероксида водорода $1 \cdot 10^{-6}$ М. При использовании коммерческой перекиси водорода в тех же условиях (при аналогичных концентрациях) эффект стимуляции был существенно слабее, что скорее всего связано с наличием в растворе стабилизаторов пероксида водорода. Раствор АПВ с концентрацией пероксида водорода $1 \cdot 10^{-4}$ М, наоборот, тормозил прорастание семян. Сравнение эффективности стимуляции

Таблица 2. Эффективность стимуляции растворов АПВ, коммерческой перекиси водорода и воды

Концентрация пероксида водорода, М	Количество проросших семян, %		
	АПВ	Пероксид водорода	Контроль (вода)
$1 \cdot 10^{-4}$	32 ± 3	38 ± 3	40 ± 2
$1 \cdot 10^{-5}$	70 ± 2	60 ± 2	
$1 \cdot 10^{-6}$	90 ± 2	68 ± 2	
$1 \cdot 10^{-6}$	95 ± 2	68 ± 2	
$1 \cdot 10^{-7}$	90 ± 3	55 ± 3	

растворов АПВ, коммерческой перекиси водорода и воды приведено в табл. 2.

Пример 3. Опытные и контрольные семена сафлора после замачивания в течение четырех часов в соответствующих растворах (контроль – вода, опыт – раствор АПВ с концентрацией пероксида водорода $6 \cdot 10^{-7}$ М) высаживали в культуральные сосуды с песком, увлажненным теми же растворами. На седьмые сутки после появления всходов в люминистате проведен учет количества растений с первым раскрытым листом. В опыте с раствором АПВ количество растений с раскрытым листом составляло 40%, в контроле – около 16%; средняя высота растений: в опыте АПВ – 6.5 см, в контроле – 4.5 см.

Пример 4. Семена редиса после замачивания в растворе с АПВ и в воде высевали в сосуды с песком, который увлажняли раствором АПВ с концентрацией пероксида $6 \cdot 10^{-5}$ М и $6 \cdot 10^{-7}$ М. Сосуды помещали в люминистат. На седьмые сутки был проведен учет количества растений в стадии полностью раскрытых семядольных листьев. Стимуляцию роста растений наблюдали вплоть до концентрации пероксида водорода $6 \cdot 10^{-7}$ М. Количество сформировавшихся растений составило 65%. Раствор АПВ с концентрацией пероксида водорода $6 \cdot 10^{-3}$ М угнетал ростовые процессы (количество сформировавшихся растений составило не более 20%). Доля сформировавшихся растений в контрольной группе не превышала 40%.

Пример 5. Семена огурца (сорт «Конкурент») замачивали в чашках Петри. Использовали растворы коммерческой перекиси водорода (контроль) с концентрацией пероксида водорода $5 \cdot 10^{-7}$ М и АПВ (опыт) с той же концентрацией пероксида водорода. Через 72 ч в опыте количество проросших семян составило 92% (с длиной корня 8–9 мм – более 80%). В контроле проросло 65% семян, а количество семян с длиной корня 8–9 мм составило 50%.

Пример 6. Из пророщенных клубней картофеля вырезали клубневые черенки и после подсушивания в течение четырех часов высаживали в сосуды с песком, которые увлажняли водой (контроль) и растворами АПВ (опыт) с концентрацией пероксида водорода $5 \cdot 10^{-5}$ М и $1 \cdot 10^{-6}$ М, и помещали в люминистат. Через восемь суток оценивали количество жизнеспособных черенков и степень развития корневой системы. В контроле выжило 50% растений, в опыте – 100%. Хорошо развитая корневая система наблюдалась в опыте у 30% черенков, а в контроле – не более чем у 10% черенков.

ВЫВОДЫ

1. Вода, активированная плазмой высокочастотного тлеющего разряда, является регулятором роста растений.
2. Состав и способ получения активированной плазмой воды позволяет считать ее экологически чистой и безопасной.
3. Выбор оптимальной концентрации активированной плазмой воды при обработке объектов растительного происхождения (в том числе сельскохозяйственных растений) позволит повысить их урожайность.
4. Активированная плазмой вода сохраняет свои свойства в течение времени, которое позволяет использовать ее в качестве готового препарата, как в защищенном, так и в открытом грунте.
5. Исходя из оценки биологической активности раствора по наличию в нем пероксида водорода и возможности сохранения его в течение достаточно длительного времени, раствор АПВ может быть отнесен к эффективным регуляторам роста растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в Институте общей физики им. М.В. Прохорова РАН при частичной финансовой поддержке Научно-исследовательского

проекта «Физические методы в сельском хозяйстве и экологии» (№ 0024-2019-0004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. Г. Комиссаров, *Фотосинтез: физико-химический подход* (УРСС, М., 2003).
2. М. М. Наумов, Т. В. Зими́на, Е. И. Хрюкина и Т. А. Рябчинская, *Агрoхимия* **5**, 21 (2019).
3. Ю. С. Корзинников, *Вестн. РАСХН* **2**, 44 (1997).
4. Л. М. Апашева и Г. Г. Комиссаров, *Изв. РАН, сер. биол.* **5**, 621 (1996).
5. G. A. Velikanov, T. A. Sibgatullin, L. P. Belova, and I. F. Ionenko, *Protoplasma* **2** (52), 1263 (2015).
6. А. В. Лобанов, Н. А. Рубцова и Г. Г. Комиссаров. *Докл. РАН. Химия* **421** (6), 773 (2008).
7. K. Takaki, J. Takahata, S. Watanabe, et al., *J. Phys. Conf. Ser.* **418**, 012140 (2013).
8. Н. В. Бабу́рин, С. В. Белов, Ю. К. Данилейко и др., *Докл. РАН. Физика* **426** (4), 468 (2009).
9. С. В. Белов, Ю. К. Данилейко и др. *Мед. техника* **2**, 26 (2011).
10. M. Ashurov, S. Belov, Yu. Danyleiko, et al., *IOP Conf. Series: Earth Environm. Sci.* **390**, 012028 (2019).
11. В. Д. Русанов, А. Л. Фри́дман и Г. В. Шолин, *Успехи физ. наук* **134** (2), 185 (1981).
12. Т. М. Васильева, *Тонкие химические технологии* **10** (2), 5 (2015).
13. Патент РФ: RU 2142707/ A01N 59/00, 20.12.1999 (1999).
14. Патент РФ: 2172099, A01G, 1/00, A01N. 59/00, A01C, 1/00, 20.08.2001 (2001).

Stimulation of Plant Growth with Aqueous Solution Activated by Glow Discharge Plasma

S.V. Belov*, L.M. Apasheva**, Yu.K. Danileiko*, A.B. Egorov*, A.V. Lobanov**, V.I. Lukanin*, E.N. Ovcharenko*, V.V. Savransky*, and L.G. Shilin*

*Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia

**Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

This paper presents the results of application of weakly concentrated aqueous solutions of strong electrolytes activated by glow discharge plasma for plant growth stimulation. We provide experimental evidence that these solutions can be used as an effective regulator of plant growth.

Keywords: plasma, activation, plants, growth regulator, hydrogen peroxide, aqueous solution

УДК 581.132

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА ВОДОЕМОВ ЗВЕНИГОРОДСКОЙ СТАНЦИИ МОСКОВСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

© 2020 г. Д.Н. Маторин, Н.П. Тимофеев, Д.А. Тодоренко, Л.Б. Братковская, С.Н. Горячев

*Биологический факультет Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12*

E-mail: matorin@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 19.11.2019 г.

После доработки 19.11.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

С использованием флуоресценции хлорофилла изучены сезонные изменения фотосинтетических процессов фитопланктона трех водоемов Звенигородской биологической станции МГУ (МГУ ЗБС). Показано, что в Ольгином и Пожарном прудах, где обнаружено высокое обилие фитопланктона, высокая фотосинтетическая активность наблюдалась в летние месяцы. Высокая фотосинтетическая активность водорослей проявлялась в высоких показателях таких параметров, как эффективность электронного транспорта (Φ_{E0}) и индекс производительности фотосистемы II (PI_{ABS}). При высокой фотосинтетической активности фитопланктона в этих водоемах наблюдались низкие показатели нефотохимического тушения (NPQ). В Стерляжем пруду в летний период у фитопланктона эффективность электронного транспорта (Φ_{E0}) была снижена. Показана зависимость функционирования световых реакций от сезонного изменения гидрохимического состава воды и изменения видового состава фитопланктона в исследуемых водоемах. Предлагается использовать параметры индукции флуоресценции (PI_{ABS} и Φ_{E0}) в качестве индикаторов состояния водорослей в водной среде.

Ключевые слова: фитопланктон, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, экология.

DOI: 10.31857/S0006302920010167

Фитопланктон является первичным звеном трофической цепи и определяет состояние и продуктивность водных экосистем [1]. При воздействии различных экологических факторов, в том числе антропогенных загрязнений, в первую очередь изменяются такие характеристики, как обилие и фотосинтетическая активность водорослей [1, 2]. Изменения на первичном трофическом уровне приводят к изменениям в остальных звеньях водной экосистемы. Поэтому регистрация характеристик фитопланктона является одним из способов оценки состояния водной среды в целом.

Фотосинтетическая активность фитопланктона зависит от световых условий, температуры, а также от обеспеченности биогенными элементами, такими как азот и фосфор. Освещенность и концентрация биогенных элементов в природных водах подвержены значительным сезонным

колебаниям и варьируют в широких пределах. Содержание биогенных элементов зависит от соотношения интенсивности процессов фотосинтеза и биохимического окисления органических веществ. За периодами высокого содержания в среде биогенных элементов следует снижение их концентрации в результате их потребления фитопланктоном, тогда как после фазы обеспеченного минеральными веществами активного роста водорослей наблюдается снижение их роста и фотосинтетической активности [1].

Флуоресценция хлорофилла в настоящее время активно применяется при проведении различных гидробиологических и океанологических работ [1–8]. Флуоресцентный метод используется для оценки концентрации хлорофилла у интактных водорослей, а также в экстрагированных из них растворах пигментов [3, 4, 6, 7]. На основе флуоресценции хлорофилла на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработана «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом»

Сокращения: ФС II – фотосистема II, ЗБС МГУ – Звенигородская биологическая станция имени С.Н. Скадовского МГУ имени М.В. Ломоносова, Q_A – первичный хинонный акцептор электрона.

(ФР.1.39.2011.11246, ПНД Ф 14.2.268-2012). Методика допущена для целей государственного экологического контроля по разделу «Количественный химический анализ вод» [2]. Интенсивность начальной флуоресценции (F_0) рекомендуется для оценки биомассы и скорости роста водорослей, а отношение переменной флуоресценции к максимальной (F_V/F_M) для оценки квантового выхода фотосинтеза, который является мерой физиологической активности водорослей.

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей стали использовать регистрацию световых кривых фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции, которые проводят на флуориметрах с импульсно-амплитудной модуляцией (РАМ – Pulse-Amplitude Modulation) [9–11]. Измерения световых зависимостей проводятся при последовательном увеличении интенсивности света. Помимо РАМ-флуориметрии также активно развиваются методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 20 мкс) при возбуждении интенсивным светом на приборах типа РЕА (Plant Efficiency Analyzer) [12–14].

Пруды Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского МГУ имени М.В. Ломоносова (ЗБС МГУ) входят в охраняемую зону и являются объектами многолетних исследований и местом проведения учебных практик студентов МГУ. Ранее мы исследовали многолетние изменения функционирования фотосинтетических процессов клеток летнего фитопланктона в этих прудах [15]. Настоящая работа посвящена изучению сезонных изменений световых и индукционных зависимостей параметров флуоресценции фитопланктона в водоемах ЗБС МГУ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на трех водоемах ЗБС МГУ с мая по ноябрь 2017 г. Пробы фитопланктона отбирали из прибрежных поверхностных вод из Стерляжьего (находится между «верхними» и «нижними» дачами) и Пожарного прудов, расположенного рядом со студенческими общежитиями, а также в Костином пруду, расположенном на месте старой каменоломни.

Пробы помещали в темные пластмассовые емкости объемом 2 л. В них измеряли температуру, гидрохимические параметры воды, видовой состав фитопланктона, концентрацию пигментов, а также параметры флуоресценции хлорофилла. Гидрохимический анализ воды проводили по стандартным общепринятым методикам [16].

Концентрацию хлорофилла определяли прямым спектрофотометрическим методом в ацетоновых экстрактах на спектрофотометре на базе пор-

тативного спектрометра USB 2000 (Ocean Optics, Inc., США).

Перед проведением регистрации флуоресцентных характеристик все исследуемые образцы выдерживали в темноте в течение 20 мин для окисления переносчиков в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, в том числе для перехода первичного хинонного акцептора электрона (Q_A^-) в окисленное состояние.

Регистрацию световых кривых фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции выполняли на флуориметре Water-PAM (Walz, Effelrich, Германия). Световые зависимости измеряли при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 1600 мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Для регистрации начальной флуоресценции (F_0) использовали слабый измерительный свет, не вызывающий фотохимических процессов. В конце каждого сеанса освещения с использованием насыщающей вспышки света (0,8 с, 3000 мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) регистрировали параметры максимальной флуоресценции (F_M) и выход флуоресценции на свету $F_{(t)}$. На основании измеренных уровней флуоресценции рассчитывали следующие параметры: $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ – максимальный квантовый выход фотохимии ФС II; $Yield = (F_M' - F_t)/F_M'$ – эффективный квантовый выход ФС II на свету; $NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$ – нефотохимическое тушение флуоресценции. Относительную скорость нециклического транспорта электронов рассчитывали по формуле [8]: $rETR = Yield \times E_i \times 0,5$, где E_i – освещенность (мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$).

Из световой кривой ($rETR$) рассчитывали: максимальную относительную скорость электронов по электрон-транспортной цепи (ETR_{max}) [8–11]. Обозначения и определения фотосинтетических параметров представлены в соответствии с общепринятой номенклатурой [9].

Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла с высоким временным разрешением (начиная с 0,05 мс) регистрировали на импульсном портативном флуориметре Aquapen-C 100 (Photon System Instruments, Чехия). Индукционные кривые флуоресценции хлорофилла a инициировали синим светом ($\lambda = 450 \text{ нм}$) интенсивностью 3000 мкмоль квантов $\cdot \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза из индукционных кривых рассчитывали параметры флуоресценции с помощью стандартного JIP-теста [17]. Этот тест использует следующие характеристики кинетической кривой индукции флуоресценции: интенсивности флуоресценции при 50 мкс (F_0), 2 мс (F_J), 30 мс (F_I), 6 с (F_{6s}), а также F_M (макси-

Содержание аммония, нитратов, нитритов и фосфатов в пробах воды из водоемов ЗБС МГУ с мая по октябрь в 2017 году

NH ₄ ⁺ , мг/л				
Водоем	Июнь	Июль	Сентябрь	Октябрь
Стерляжий	3	1.6	1	1.4
Пожарный	80	72	100	56
Костин	3.6	2.4	4	1.6
NO ₃ ⁻ , мг/л				
Стерляжий	1	2	10	0
Пожарный	2.5	2.3	25	23
Костин	2	2.5	17	15
NO ₂ ⁻ , мг/л				
Стерляжий	0.05	0.05	0	0.01
Пожарный	0.15	0.05	0	0.07
Костин	0.10	0.40	0	0.20
PO ₄ ⁺ , мг/л				
Стерляжий	0.125	0.05	0.05	0.05
Пожарный	5.00	0.18	0.20	5.00
Костин	0.075	0.03	0.30	0.45

мальная интенсивность флуоресценции), а также усредненную величину в мс⁻¹ начального наклона относительной переменной флуоресценции хлорофилла *a* (M_0). Эти величины затем использовали для расчета следующих параметров:

– F_V/F_M – максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в ФС II как $F_V/F_M = (F_M - F_O)/F_M$;

– V_J – относительная амплитуда фазы O-J (после 2 мс освещения). Отражает количество закрытых реакционных центров по отношению к общему числу реакционных центров, которые могут быть закрыты как $V_J = (F_J - F_O)/(F_M - F_O)$;

– Φ_{E0} – квантовый выход электронного транспорта за пределы Q_A (при $t = 0$) как $\Phi_{E0} = (1 - V_J)/(F_V/F_M)$;

– ABS/RC – поток энергии, поглощаемый одним активным реакционным центром, характеризует относительный размер антенны:

$$ABS/RC = (TR_0/RC)/(TR_0/ABS) = M_0/V_J(1/\Phi_{P0}) = (M_0/V_J)/[(F_M - F_O)/F_M];$$

– PI_{ABS} – индекс производительности – показатель функциональной активности ФС II, относенный к поглощаемой энергии как $PI_{ABS} = [1 - (F_O/F_M)]/(M_0/V_J)[(F_M - F_O)/F_O][1 - V_J]/V_J$.

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и Statistica v.6 (StatSoft, Inc., США). Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью двухвыборочного *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, уровень значимости принимали равным 0.05. Объем выборки для контрольных и опытных образцов составлял не менее десяти повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Гидрохимические показатели воды. Содержание биогенных элементов в исследуемых прудах было подвержено заметным сезонным колебани-

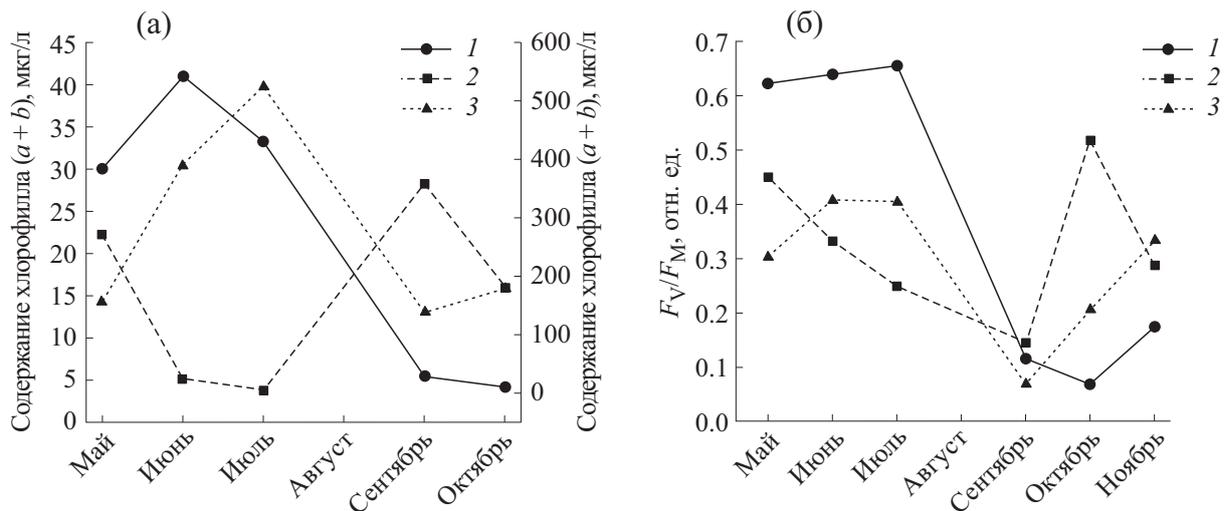


Рис. 1. Изменение содержания хлорофилла *a* (а) и значения максимального квантового выхода ФС II (F_V/F_M) (б) фитопланктона в водоемах ЗБС МГУ с мая по октябрь 2017 г.: 1, 2, 3 – пробы из Пожарного, Стерляжьего и Костиного прудов соответственно. На рисунке (а) слева приведена ось содержания хлорофилла в Стерляжьем и Костином прудах, справа – в Пожарном пруду.

ям и значительно различалось между водоемами (таблица). Как видно из таблицы, наибольшее содержание биогенных элементов наблюдались в Пожарном пруду в течение всего периода исследований с июня по октябрь.

Содержание аммонийного азота было наибольшим в начале лета во всех водоемах. Максимальные концентрации аммонийного азота отмечены в Пожарном пруду с июня по октябрь с максимумом в сентябре – 100 мг/л. Такие высокие показатели аммонийного азота в Пожарном пруду свидетельствуют о процессах сильной эвтрофикации поверхностных вод водоема вследствие загрязнения водоема сточными водами. Низкое содержание аммонийного азота наблюдалось в Стерляжьем пруду.

Наименьшая концентрация нитратного азота отмечалась в летний сезон, что было связано с ассимиляцией нитрата фитопланктоном. Так, концентрация нитратов в летние месяцы во всех прудах не превышала 2.5 мг/л. В осенний период содержание нитратов в воде увеличивалось в пятьдесят раз по сравнению с летним периодом.

Содержание нитритов в воде обусловлено процессами нитрификации, в результате чего происходит превращение связанных форм азота в нитраты. Минимальное содержание нитритов в исследуемых водоемах отмечалось в сентябре. Высокое содержание нитритов отмечалось в летний период во всех исследуемых водоемах.

Содержание фосфатов было минимальным в июле, что связано с повышением температуры воды и развитием продукционных процессов. К

осени наблюдалось увеличение минеральных форм фосфатов в результате деструкции органического вещества. Так, в Пожарном и Костином прудах осенью наблюдалось повышение концентрации фосфатов больше, чем в десять раз по сравнению с летним периодом от 0.18 и 0.03 мг/л в июле до 5.0 и 0.45 мг/л в октябре соответственно.

Сезонная динамика фитопланктонного сообщества и его фотосинтетической активности. В каждом исследованном водоеме ЗБС МГУ наблюдали разную смену доминирующих групп водорослей и разную динамику их фотосинтетической активности.

В Пожарном пруду в условиях повышенной концентрации биогенных элементов наблюдалось «гиперцветение» водоросли *Chlorella vulgaris*, составляющей практически 100% от общей численности (максимальная численность отмечена в мае – $4.9 \cdot 10^{10}$ кл/л). Концентрация хлорофилла в июне достигла достаточно высоких значений (рис. 1а). Высокая численность фитопланктона сопровождалась высокими значениями квантового выхода флуоресценции F_V/F_M в период с мая по июль – до 0.7 (рис. 1б). К сентябрю сообщество с доминированием хлореллы сменилось на сообщество с доминированием цианобактерий. Их фотосинтетическая активность была очень низкой – до 0.2 по параметру F_V/F_M .

В Костином пруду в период с мая по сентябрь доминировали цианобактерии рода *Microcystis* (от 86 до 97% от общей численности). В октябре их

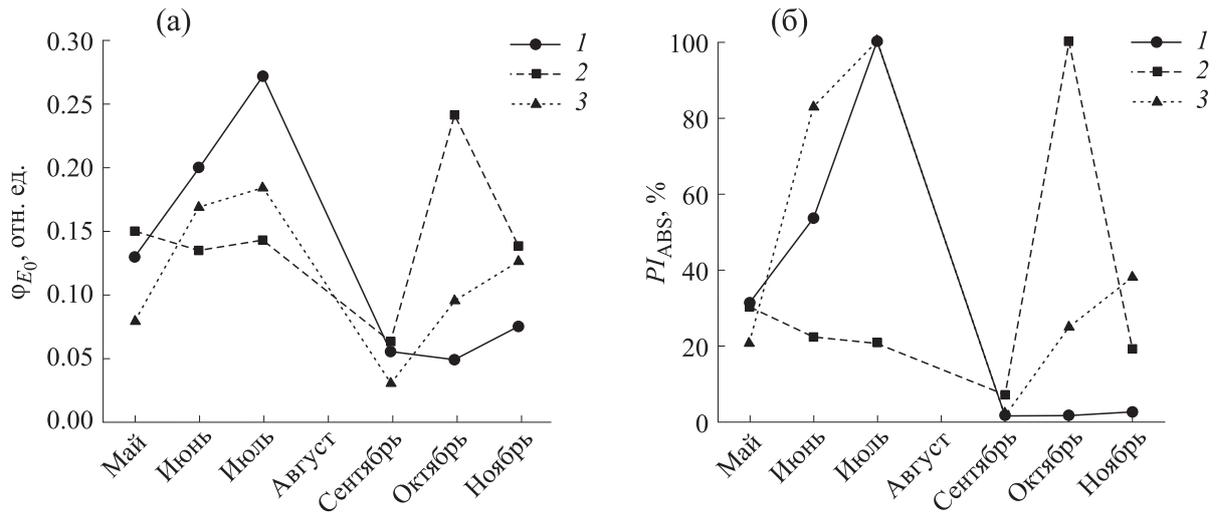


Рис. 2. Изменение параметров JIP-теста (ϕ_{E_0} – квантовый выход переноса электронов далее Q_A^- ; PI_{ABS} – совокупный индекс производительности ФС II) фитопланктона в водоемах ЗБС МГУ с мая по октябрь 2017 г.: 1, 2, 3 – из Пожарного, Стерляжьего и Костиного прудов соответственно.

сменяли охрофитовые (преимущественно золотистая водоросль *Kephyrion amphorula*) и зеленые водоросли в соотношении 47 и 50% соответственно. Максимальный квантовый выход флуоресценции выявлен в июне–июле со значением $F_V/F_M = 0.4$. В сентябре наблюдался сильный спад фотосинтетической активности, после которого активность вновь повышалась до 0.33 к осеннему периоду.

В Стерляжем пруду, в отличие от Пожарного и Костиного прудов, пики фотосинтетической активности приходились на май и октябрь со значениями $F_V/F_M = 0.45$ и 0.52 соответственно.

В летний период в Стерляжем пруду наблюдалось уменьшение фотосинтетической активности (рис. 1б). Наибольшие концентрации хлорофилла наблюдались в мае (33.5 мкг/л) и сентябре (39.6 мкг/л) (рис. 1а). В условиях пониженной концентрации минеральных веществ к середине лета происходила смена сообществ фитопланктона с охрофитовых и зеленых водорослей на сообщество, состоящее в основном из миксотрофных представителей отдела эвгленовых. Осенний пик активности сопровождался доминированием динофитовых водорослей.

Параметры индукционных и световых кривых флуоресценции фитопланктона. Для более подробного анализа функционального состояния фотосинтетического аппарата были проанализированы параметры индукции флуоресценции, характеризующие состояние переносчиков между двумя фотосистемами [17]. Среди параметров флуоресценции, полученных из индукционных кривых с помощью JIP-теста, нами были выбра-

ны следующие параметры: ϕ_{E_0} , характеризующий перенос электронов за пределы Q_A^- ; ABS/RC , характеризующий количество световой энергии, поглощенной одним реакционным центром (RC); а также PI_{ABS} – совокупный индекс производительности ФС II, зависящий от параметров F_V/F_M , ϕ_{E_0} и ABS/RC .

Одним из наиболее чувствительных параметров по отношению к стрессу является индекс производительности ФС II (PI_{ABS}) [18]. Было выявлено, что по параметру PI_{ABS} в Стерляжем пруду пик фотосинтетической активности приходился на октябрь, а в Пожарном и Костином – в июле (рис. 2б). Поскольку при расчете параметра PI_{ABS} используется ряд других параметров (F_V/F_M , ϕ_{E_0} и ABS/RC), то можно проследить, какие именно из этих трех параметров вносят наибольший вклад в изменение PI_{ABS} . Так, июльский максимум в Пожарном и Костином прудах обусловлен повышением эффективности переноса электронов дальше ФС II (ϕ_{E_0}) (рис. 2а). Так, ϕ_{E_0} увеличивался с мая по июль от 0.13 до 0.27 и от 0.08 до 0.18 в Пожарном и Костином прудах соответственно, в то время как значения F_V/F_M достигали максимального значения, особенно в Пожарном пруду. Эти результаты согласуются с увеличением скорости нециклического электронного транспорта ($rETR_{max}$) в период с мая по июль в этих двух прудах (рис. 3а). Полученные данные мы связываем с увеличением активности темновых реакций фотосинтеза [19, 20].

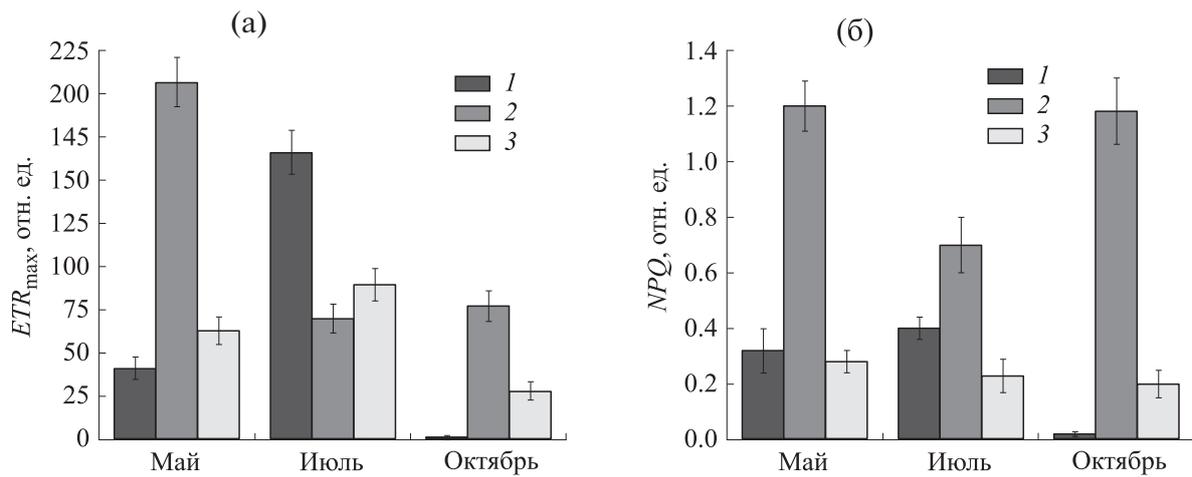


Рис. 3. Изменение максимальной относительной скорости транспорта электронов (ETR_{max}) (а) и уровня нефотохимического тушения (NPQ) при освещенности $1600 \text{ мкмоль квантов} \times \text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ (б) фитопланктона в водоемах ЗБС МГУ с мая по октябрь 2017 г.: 1, 2, 3 – из Пожарного, Стерляжьего и Костинского прудов соответственно.

В Костинском пруду рост PI_{ABS} наблюдался осенью, который был обусловлен значительным изменением всех трех параметров, входящих в состав PI_{ABS} . Так, увеличивался квантовый выход разделения зарядов и переноса электронов далее ФС II, а также существенно уменьшалось значение ABS/RC . Параметр ABS/RC снижался от 35.4 (в сентябре) до 8.9 (в ноябре), что связано с уменьшением среднего размера антенны, а также с увеличением количества активных реакционных центров.

В Стерляжьем пруду летом наблюдалось уменьшение количества активных реакционных центров ФС II. Об этом свидетельствует возрастание параметра ABS/RC от 7.3 до 13.4 и уменьшение максимального квантового выхода (F_V/F_M). В то же время квантовый выход переноса электронов (Φ_{E_0}) остался постоянным в период с мая по июль со значением около 0.15.

Световые кривые флуоресценции были получены при исследовании реакции фитопланктона на возрастающую световую нагрузку. Из световых кривых флуоресценции рассчитывались максимальная скорость нециклического электронного транспорта ($rETR_{max}$) и параметр нефотохимического тушения (NPQ) (рис. 3).

В Пожарном и Костинском прудах максимальные значения $rETR_{max}$ приходились на июль, тогда как в Стерляжьем пруду – на май. Минимальные значения $rETR_{max}$ наблюдались в Пожарном и Костинском прудах в октябре, а в Стерляжьем пруду – в июле (рис. 3а).

Наибольшие значения NPQ во все сезоны наблюдались в Стерляжьем пруду. В Пожарном пруду обнаружено небольшое увеличение NPQ в июле, а в октябре уровень NPQ , как и $rETR_{max}$, снижался практически до нуля. Фитопланктон из Костинского пруда отличался самыми низкими значениями NPQ (рис. 3б).

В целом полученные значения нециклического электронного транспорта соответствовали наблюдаемому пику квантового выхода разделения зарядов в ФС II (F_V/F_M), а также зависели от видового состава фитопланктона. Так, в Стерляжьем пруду повышалась фотосинтетическая активность в октябре по сравнению с июлем, но видовой состав оставался примерно таким же. Кроме того, существенного повышения ETR_{max} не наблюдалось. С другой стороны, в Пожарном пруду в мае и июле доминировала хлорелла, а скорость электронного транспорта возрастала в четыре раза. Это, возможно, связано с активацией темновых реакций цикла Кальвина–Бенсона в более теплый летний период [19, 20].

Измерение параметра нефотохимического тушения (NPQ) позволяет объяснить наблюдаемые пики фотосинтетической активности в прудах. Как видно из рис. 3б, у фитопланктона в Стерляжьем пруду наблюдали самые высокие значения NPQ во все исследуемые сезоны. Известно, что недостаток минеральных веществ приводит к увеличению чувствительности к световым нагрузкам. Из-за недостатка биогенных элементов водоросли снижают эффективность репарации белка второй фотосистемы D1, который разрушается под действием высокой интенсивности света, что приводит к увеличению квантового выхо-

да нефотохимического тушения (NPQ). Возможно, это является причиной того, что в Стерляжьем пруду, в период наибольшей световой нагрузки, к середине лета начинают развиваться эвгленовые водоросли, способные переходить на гетеротрофный тип питания. В Костином и Пожарном прудах, где содержание биогенных элементов было относительно высоким в летний период, значения NPQ были ниже 0.4.

Изучение процессов фотоингибирования фотосинтеза фитопланктона. Ранее в работе [15] было показано, что в 2017 г. пики фотосинтетической активности в двух прудах (Костином и Пожарном) приходились на июль. В связи с этим нами было проведено исследование восстановления фотосинтетического аппарата фитопланктона по параметру F_V/F_M после фотоингибирования в течение часа светом с интенсивностью $3000 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

Известно, что высокие интенсивности света приводят к ингибированию фотосинтетических процессов у природного фитопланктона [1]. Данное явление в природных условиях называется полуденной депрессией или фотоингибированием фотосинтеза. Скорость восстановления фотосинтетической активности после фотоингибирования зависит от скорости репарации белка D1 комплекса ФС II [21].

У фитопланктона в Стерляжьем пруду значения F_V/F_M не восстанавливались после длительного фотоингибирования. Сразу после выключения освещения показатель F_V/F_M составил 41% от исходного значения, через час после выключения – 48%. У фитопланктона в Пожарном пруду F_V/F_M восстанавливался с 49.1% до 81.8% от исходного значения. В Костином пруду фитопланктон практически не подвергался фотоингибированию. После выключения освещения квантовый выход фитопланктона из данного пруда уже составлял 82%; в течение часа он восстанавливался до 88%.

Полученные различия в восстановлении квантового выхода фотохимии ФС II после фотоингибирования были обусловлены тем, что в Пожарном и Костином прудах фитопланктон в июле находится на пике своей фотосинтетической активности – в отличии от фитопланктона из Стерляжьего пруда, который находится в состоянии летней депрессии (рис. 2б). Кроме того, фитопланктон из Стерляжьего пруда отличался высокими значениями NPQ (рис. 3б), что свидетельствует о его высокой чувствительности к световой нагрузке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение современных биофизических подходов (световых и индукционных кривых

флуоресценции хлорофилла) позволили выявить изменения особенностей функционирования световых стадий, протекающих в фотосинтетическом аппарате фитопланктона в водоемах ЗБС МГУ в разные сезоны. Результаты работы показали, что по параметрам флуоресценции хлорофилла можно определить сезонные пики активности природного фитопланктона. Было показано, что сезонные изменения активности фотосинтетического аппарата фитопланктона зависят от обеспеченности биогенными элементами и видового состава.

В Стерляжьем пруду основными доминирующими группами были представители отделов охрофитовых и динофитовых водорослей, у которых дополнительным пигментом вместо хлорофилла b является хлорофилл c . Ранее показано, что фотосинтезирующие организмы, у которых отсутствует хлорофилл b , более чувствительны к высоким интенсивностям света [22]. В связи с этим пики фотосинтетической активности у фитопланктона этого пруда наблюдались весной и осенью, когда освещенность была не такой высокой как летом. Тем не менее параметр нефотохимического тушения (NPQ) оставался высоким во все сезоны. В середине лета в период наибольшей освещенности возрастает потребность в минеральном питании и повышается чувствительность ФС II к фотоингибированию. Это проявилось в эксперименте по искусственному фотоингибированию фотосинтетической активности фитопланктона. Фитопланктон из Стерляжьего пруда не восстановился после интенсивного освещения в течение часа, что связано с замедлением скорости синтеза белка D1 комплекса ФС II вследствие недостатка биогенных веществ.

Зависимость обилия фитопланктона от концентрации биогенных веществ наиболее ярко прослеживалась на примере Пожарного пруда. В условиях высокой эвтрофикации в весенне-летний период 2017 г. в этом пруду нами обнаружено цветение монокультуры *Chlorella vulgaris* с очень высокой активностью ФС II, определенной по параметрам F_V/F_M , PI_{ABS} и Φ_{E_0} . Следует отметить, что ранее Пожарный пруд характеризовался низкой концентрацией фитопланктона и низким квантовым выходом фотохимии ФС II (F_V/F_M) [15]. Активность фитопланктона в Пожарном пруду в 2017 г. достигла максимума в июле с последующим уменьшением в осенний период.

В Костином пруду с мая по сентябрь доминировали представители отдела цианобактерий *Microcystis spp.*, которые характеризовались низкими значениями NPQ во все сезоны.

Результаты анализа параметров флуоресценции ЛР-теста позволили выявить особенности функционирования фотосинтетического аппарата фитопланктона исследуемых водоемов. Во-первых, с помощью совокупного индекса производительности ФС II (PI_{ABS}) были выявлены пики активности ФС II, которые наблюдались в Пожарном и Костином прудах в июле, а в Стерляжьем пруду в октябре. Во-вторых, было выявлено, что наблюдаемый пик активности в июле обусловлен увеличением квантового выхода переноса электронов далее Q_A^- (Φ_{E_0}). Кроме того, в этих прудах мы также наблюдали увеличение максимальной скорости нециклического электронного транспорта (ETR_{max}) в июле.

Понижение производительности ФС II (PI_{ABS}) в Стерляжьем пруду было обусловлено понижением квантового выхода разделения зарядов (F_V/F_M) и увеличением доли поглощенной энергии на один реакционный центр (ABS/RC), тогда как значения Φ_{E_0} с мая по июль оставались неизменными. Во всех прудах отмечали обратную зависимость между долей энергии, диссипированной в тепло (NPQ), и фотосинтетической активностью.

Анализ данных по сезонной динамике природного фитопланктона показал, что состояние фитопланктона подвержено значительным сезонным колебаниям, а флуоресцентные методы могут быть использованы для получения оперативной информации о состоянии природного фитопланктона.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность директору ЗБС МГУ В.М. Гаврилову за помощь в организации исследований и Н.А. Шидловской за измерение гидрохимического состава воды.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. G. Falkowski and J. A. Raven, *Aquatic photosynthesis* (Princeton University Press, Princeton, 2013).

2. Д. Н. Маторин, В. А. Осипов и А. Б. Рубин, *Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты* (Альтрекс, М., 2012).
3. D. N. Matorin, T. K. Antal, M. Ostrowska, et al., *Oceanologia* **46** (4), 519 (2004).
4. M. Ostrowska, R. Majchrowski, D. N. Matorin, et al., *Oceanologia* **42** (2), 203 (2000).
5. Д. Н. Маторин и А. Б. Рубин, *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей* (ИКИ-РХД, Ижевск, 2012).
6. T. K. Antal, P. S. Venediktov, D. N. Matorin, et al., *Oceanologia* **43** (3), 291 (2001).
7. V. V. Fadeev, E. M. Filippova, D. V. Maslov, et al., *P. Soc. Photo-opt. Ins.* **3821**, 248 (1999).
8. S. A. Mosharov, V. M. Sergeeva, A. F. Sazhin, et al., *Estuar. Coast. Shelf. S.* **218**, 59 (2019).
9. U. Schreiber, in *Chlorophyll a fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Ed. by G. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004), pp. 279–319.
10. P. J. Ralph and R. Gademann, *Aquat. Bot.* **82**, 222 (2005).
11. J. Serodio, S. Vieira, S. Cruz, and F. Barroso, *Mar. Biol.* **146**, 903 (2005).
12. В. Н. Гольцев и др., *Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла а – теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений* (ИКИ-РХД, Ижевск, 2014).
13. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, S. Qiang, and V. Goltsev, *Biochim. Biophys. Acta* **1797** (6–7), 1313 (2010).
14. D. Lazar and G. Schansker, in *Photosynthesis in Silico*, Ed. by A. Laisk, L. Nedbal and Govindjee (Springer, Dordrecht, 2009), pp. 85–123.
15. Д. Н. Маторин, Н. П. Тимофеев, М. Л. Синдаловская и др., *Биофизика* **64** (6), 1057 (2019).
16. Н. С. Строганов и Н. С. Бузинова, *Практическое руководство по гидрохимии* (МГУ, М., 1980).
17. R. J. Strasser, M. Tsimilli-Michael, and A. Srivastava, in *Chlorophyll a fluorescence: A signature of Photosynthesis*, Ed. by G. Papageorgiou and Govindjee (Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004), pp. 321–362.
18. M. Zivcak, M. Brestic, K. Olsovska, et al., *Plant Soil. Environ.* **54** (4), 133 (2008).
19. J. A. Raven and R. J. Geider, *Wiley Online Library* **110** (4) (1988).
20. I. R. Davison, *Wiley Online Library* **27** (1) (1991).
21. E. Tuystjärvi, *Coordination Chem. Rev.* **252** (3–4), 361 (2008).
22. Z.-F. Lin, G.-Z. Lin, and C.-L. Peng, *Photosynthetica* **47** (1), 46 (2009).

Seasonal Changes of Chlorophyll Fluorescence in Reservoirs of the Zvenigorod Station of Lomonosov Moscow State University

Matorin D.N., Timofeev N.P., Todorenko D.A., Bratkovskaya L.B., Goryachev S.N.

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

The seasonal changes of the photosynthetic processes of phytoplankton in three reservoirs of the Zvenigorod Biological Station at Moscow State University (ZBS MSU) were studied by using chlorophyll fluorescence. It was shown that high photosynthetic activity was observed in Olgin and Pozharny reservoirs (where a high abundance of phytoplankton was found) in the summer months. The high photosynthetic activity of algae was manifested in high efficiency of electron transport (φ_{E_0}) and performance index of PSII (PI_{ABS}). At high photosynthetic activity of phytoplankton in these reservoirs, low rates of non-photochemical quenching (NPQ) were observed. Whereas, the efficiency of electron transport (φ_{E_0}) of phytoplankton in Sterlyazhy reservoir was reduced in summer. The dependence between light reactions of phytoplankton and seasonal changes of hydrochemical composition of water and species composition of phytoplankton in the studied reservoirs was shown. It is proposed to use the fluorescence parameters (PI_{ABS} and φ_{E_0}) as indicators of the state of phytoplankton in aquatic environments.

Keywords: phytoplankton, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, ecology

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПОЧКИ КРЫСЫ

© 2020 г. А.Е. Гордеева, М.Г. Шарапов, В.А. Евдокимов, В.И. Новоселов, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.01.2020 г.

После доработки 14.01.2020 г.

Принята к публикации 24.01.2020 г.

Целью исследования являлось изучение защитного эффекта экзогенных пероксиредоксинов при ишемии–реперфузии изолированной почки. Исследование проводилось с использованием модели перфузии изолированной почки крысы *ex vivo*. Рекомбинантный пероксиредоксин 6 вводили непосредственно в состав перфузионного буфера. Высокомолекулярный краситель декстран голубой Blue Dextran 2000 и мочевины добавляли в перфузионный буфер для определения функциональности изолированной почки. Показано, что корковом слое изолированной почки экзогенный пероксиредоксин 6 локализовался в сосудах клубочков почек; в мозговом веществе – в микрососудах, окружающих тонкие каналы. Использование пероксиредоксина 6 снижает степень повреждения структур нефронов в два раза по сравнению с контрольным повреждением, что обеспечивает сохранение процессов ультрафильтрации. Уменьшение повреждения клубочков приводит к уменьшению содержания декстрана голубого в моче в два раза по сравнению с контрольным повреждением в конце периода перфузии. Уменьшение повреждения трубчатых структур указывает на активный транспорт мочевины в течение перфузии. Таким образом, включение пероксиредоксина 6 в перфузионный буфер опосредует уменьшение повреждения структур нефронов и поддержание морфофункционального состояния почечных клубочков и канальцев.

Ключевые слова: изолированная почка, нефроны, пероксиредоксины, ишемия–реперфузия.

DOI: 10.31857/S0006302920020179

В настоящее время основным фактором, сдерживающим развитие трансплантологии, является недостаток донорских органов. Дефицит донорских органов еще больше усугубляется на фоне роста числа операций по ретрансплантации. Эта ситуация заставляет многие медицинские центры проводить забор органов у субоптимальных доноров [1–4]. Основным ограничением, снижающим широкое использование трансплантатов, полученных от субоптимальных доноров, является повреждающий эффект каскада ишемически-реперфузионных повреждений. Органы, полученные от субоптимальных доноров, обладают низкой толерантностью к ишемически-реперфузионному повреждению [4–6]. Это связано с тем, что ишемия при заборе органа у донора и последующая реперфузия трансплантата приводит к резкому повышению уровня высокотоксичных активных форм кислорода в ткани транспланта-

та, что приводит к повреждению эндотелия и развитию тяжелых осложнений: отторжению пересаженного органа и первичной дисфункции трансплантата. Таким образом, для успешной защиты ткани трансплантата необходимо блокировать раннюю стадию реперфузионного повреждения, приводящую к поражению тканей, а именно стадию выработки активных форм кислорода. Это может быть достигнуто использованием мощных экзогенных антиоксидантов.

В настоящей работе для защиты трансплантата почки от свободнорадикального окисления при перфузии использовался мощный фермент-антиоксидант класса пероксиредоксинов – пероксиредоксин 6 (Prx6). Ранее было показано, что экзогенный Prx6 был эффективен для повышения антиоксидантного статуса в ткани при свободнорадикальных патологиях [7–12]. Для изучения возможности использования экзогенных пероксиредоксинов для улучшения морфофункциональных показателей изолированной

Сокращение: Prx6 – пероксиредоксин 6.

органа в настоящей работе была использована модель перфузии изолированной почки крысы *ex vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Были использованы крысы-самцы линии Wistar (масса тела 200–220 г), которых содержали в условиях вивария ИБК РАН (г. Пушкино Московской области).

Пероксиредоксин 6. Рекомбинантный P₆ был получен в нашей лаборатории. Белок содержит шесть остатков гистидина на карбоксильном конце полипептидной цепи – His-tag-домен. Наличие His-tag-домена на карбоксильном конце молекулы P₆ не влияет на пероксидазную активность и субстратную специфичность белка и позволяет дифференцировать экзогенный пероксиредоксин от эндогенных пероксиредоксинов. Удельные активности P₆ составляют: пероксидазная – 90–120 нмоль/мг/мин по H₂O₂ и 60–80 нмоль/мг/мин по *трет*-бутил-гидропероксиду [13].

Алгоритм перфузии изолированной почки. Крысы были наркотизированы путем внутривенного введения 0.5 мл 3.5%-го (3 мг/кг) золетила 100. Для предотвращения свертываемости крови использовали гепарин. После предоперационной подготовки проводили декапитацию. Момент декапитации соответствует началу периода ишемии. Период ишемии составляет 45 мин. С началом ишемии проводили изолирование правой почки от общей сосудистой системы путем последовательного наложения лигатур на сосуды и катетеризацию почечной артерии через брюшную аорту [14]. Дополнительно проводили отсечение нижней полой вены на уровне правой внутренней и левой внутренней почечной долей, с ее последующей катетеризацией. Правый мочеточник был изолирован, катетеризирован и помещен в резервуар для сбора мочи. Препарат изолированной почки извлекали из организма в комплексе с печенью. В качестве раствора для перфузии использовали питательную среду DMEM (GIBCO, Invitrogen, США) с содержанием глюкозы 4.5 г/л. В среду включали антидиуретический гормон (0.25 мкг/л). Перед перфузией раствор оксигенировали смесью O₂/CO₂ (95%/5%), pH 7.4. Температура раствора субнормотермическая (30–35°C).

Через 10 мин ишемии проводили удаление крови из сосудистого русла изолированной правой почки путем ее промывки перфузионным буфером в течение двух минут. Для определения эффектов экзогенного пероксиредоксина 6 в перфузионный буфер добавляли P₆ в концентрации 0.1 мг/мл и перфузировали им почку на этапе удаления крови из сосудистого русла изолированной правой почки. Скорость перфузии на дан-

ном этапе – 3 мл/мин. Концентрация экзогенного P₆ в перфузионном растворе была выбрана на основании полученных ранее данных по эффективному снижению ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника с помощью P₆ [11, 15].

По окончании ишемии проводили перфузию изолированной почки перфузионным буфером в течение 50 мин. На данном этапе P₆ в перфузионном буфере отсутствует. Скорость перфузии на данном этапе равнялась 3–5 мл/мин, что соответствовало давлению 120–110 мм рт. ст. В течение всего срока перфузии каждые 10 мин осуществляли сбор мочи из мочеточника и перфузионного раствора из вены. По окончании перфузии почечную ткань фиксировали для дальнейшего исследования.

Гистологический анализ почечной ткани. Для проведения морфологических исследований почки помещали в фиксатор Myrsky's Fixative (Merck, США) для гистологического материала с последующим заключением в парафин. Парафиновые срезы получали на микротоме (Thermo Electron Corporation, США) и окрашивали гематоксилин-эозином (VITROSTAIN Biovitrum, Россия). Толщина среза 3 мкм. Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM 6000 (Leica Microsystems CMS GmbH, Германия) с цифровой камерой Leica DFC 490.

Иммуногистохимический анализ. Для исследования распределения экзогенного пероксиредоксина 6 по почечной ткани в условиях изолированной перфузии почку перфузировали P₆-His-tag (3 мг/мл) в течение трех минут с предварительным удалением крови из сосудистого русла правой почки по общей схеме, описанной выше. После перфузии образцы почечной ткани фиксировали для приготовления гистологического материала. Для выявления экзогенного пероксиредоксина 6 использовали кроличьи поликлональные антитела к His-tag (1 : 100) (Bioss, США). Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM 6000, фотографии получали с помощью цифровой камеры для микроскопии Leica DFC 490.

Определение повреждения структуры нефронов изолированной почки при перфузии. Для определения степени повреждения структур почечного тельца использовался высокомолекулярный краситель декстран голубой Blue Dextran 2000 с молекулярной массой 2000 кДа, (GE Healthcare, Швеция), который в норме не способен проходить через стенки микрососудов. Blue Dextran 2000 (0.2%) добавляли в перфузионный раствор и перфузировали изолированную почку по общей схеме в течение 50 мин. Каждые 10 мин проводили сбор мочи и венозного оттока и определяли концентрацию красителя на длине волны 650 нм с

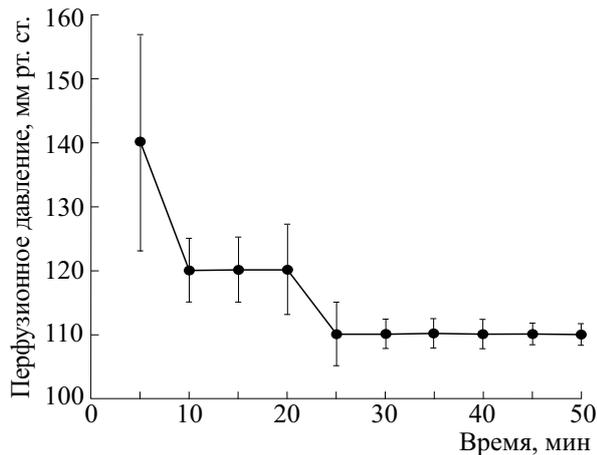


Рис. 1. Динамика перфузионного давления в изолированной почке при контрольном поражении. Скорость перфузии 3–5 мл/мин; $N = 15$.

помощью спектрофотометра ND 1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения повреждений структур почечных канальцев в перфузионный раствор вводили мочевины в концентрации 10 мМ. Данная концентрация соответствует нормальным значениям данного метаболита в сыворотке крови крыс [16]. Перфузировали по общей схеме в течение 50 мин. Каждые 10 мин проводили сбор мочи и венозного оттока и определяли концентрацию мочевины на приборе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария).

Статистические методы. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc., США). Результаты выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка. Значение $p < 0.05$ принимали статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Параметры перфузии изолированной почки.

Динамика перфузионного давления при контрольном поражении в изолированной почке представлена на рис. 1. На начальном этапе перфузии скорость перфузионного потока составляет 3–5 мл/мин, при этом наблюдается рост перфузионного давления до 140 мм рт. ст., что связано с вазоконстрикцией почечной артерии, которая обуславливает высокое перфузионное давление в этот период. Через 5–7 мин давление стабилизируется и выходит на плато со значением 110 мм рт. ст. Исследование изменения перфузионного давления показало, что как в контрольном поражении, так и при использовании перокси-редоксина 6 показатели давления достоверно не отличаются.

Скорость выделения мочи при перфузии изолированной почки составляет 0.03 мл/мин, напротив, использование перокси-редоксина 6 приводит к снижению скорости выделения мочи до 0.01 мл/мин, при этом зависимость скорости выделения мочи от времени не обнаружена. Скорость оттока перфузионной жидкости из вены составляет около 3 мл/мин и не изменяется при использовании перокси-редоксина 6.

Гистологический анализ почечной ткани. На рис. 2а представлена гистология интактной почки. В корковом слое хорошо дифференцируются отделы нефрона: почечное тельце с центральным сосудистым клубочком и почечные извитые канальца — проксимальный (клетки канала имеют выраженную щеточную каемку) и дистальный. Заметны начальные отделы собирательных трубок. В мозговом слое преобладает тонкий каналец, имеющий нисходящий сегмент, петлю Гентле и восходящий сегмент; имеют продолжение собирательные трубки.

В случае 45-минутного периода ишемии и последующего 50-минутного периода реперфузии изолированной почки перфузионным раствором наблюдаются дистрофические изменения структур почечной ткани (рис. 2б). В корковом слое почки наблюдаются полное разрушение структуры половины почечных телец, что препятствует нормальной работе фильтрационного аппарата. Общий размер сохраненных почечных телец не увеличен по сравнению с интактной структурой. В проксимальных и дистальных канальцах наблюдается дистрофия эпителия, а сам каналец расширен. Отмечена утрата большей части эпителиоцитов канальцев: эпителиоциты утрачивают соединение с базальной мембраной и заполняют просвет канальца бесструктурными массами. Поражение почечной ткани имеет зональность и более сильно выражено в корковом слое, снижаясь к латеральному краю. В мозговом веществе отмечается дилатация каналов и поражения клеток отделов тонкого канальца. Просветы отдельных каналов заполнены хлопьевидными агрегатами и клеточным мусором.

В условиях использования Rgxb отмечено снижение степени поражения почечных структур в модели перфузии изолированной почки (рис. 2в). Это в первую очередь выражено в снижении количества пораженных почечных телец в два раза относительно контрольного поражения. Общий размер сохраненных почечных телец не увеличен по сравнению с интактной структурой. Для трубчатых структур нефрона (проксимальный, дистальный, тонкий каналец) отмечено снижение поражения и сохранение общей структурной организации. Встречаются канальцы в состоянии резко выраженной дистрофии с очаговым поражением эпителия, особенно для проксимальных

каналов. В просветах многих канальцев отмечен клеточный мусор и хлопьевидные агрегаты. В мозговом веществе отмечаются дилатация каналов и снижение повреждений внутренней организации отделов тонкого канальца. Просветы отдельных каналов заполнены хлопьевидными агрегатами и клеточным мусором.

Распределение экзогенного Ргхб по почечной ткани в условиях изолированной перфузии. Так как Ргхб является высокомолекулярным соединением, было необходимо выяснить, как он распределяется в почке при его введении в кровеносное русло почки. Для дифференциации экзогенного Ргхб от эндогенного Ргхб использовали антитела против His-tag-домена в молекуле Ргхб. На рис. 3 представлены данные иммуногистохимического анализа, отражающие локализацию экзогенного белка Ргхб в изолированной почке крысы. Было отмечено распределение белка по всему периметру органа. В корковом слое почек экзогенный Ргхб локализуется преимущественно в сосудах почечных клубочков (рис. 3а,в). Проникновение экзогенного Ргхб в капсулу почечного тельца и в просвет канальцев не отмечено (рис. 3в). В мозговом слое экзогенный Ргхб локализован в микрососудах, сопровождающих тонкий каналец. В просвете тонкого канальца экзогенный Ргхб не обнаруживается (рис. 3б). В качестве контрольного теста использовали негативный контроль, в котором при проведении иммуноокрашивания исключалась инкубация с антителами к His-tag-домену. Результаты реакции, представленные на рис. 3г, отрицательные, что свидетельствует о специфичном связывании антител к His-tag-домену экзогенного Ргхб.

Определение повреждения структуры нефронов изолированной почки при перфузии. Для определения сохранения процессов ультрафильтрации в почечном тельце в перфузионный раствор вводили краситель декстран голубой (Blue Dextran 2000). На рис. 4 представлена динамика появления красителя декстрана голубого в моче в течение всего срока перфузии. В контрольном поражении уже через 10 мин перфузии в моче отмечено значительное количество декстрана голубого – 40% от его концентрации в перфузионной среде, что указывает на развитие повреждений структур почечного тельца с первых минут перфузии. Напротив, в случае применения экзогенного Ргхб выход декстрана в мочу на начальном этапе перфузии снижен и составляет 12.5% от его концентрации в перфузионном буфере. К концу перфузионного периода в случае использования Ргхб концентрация красителя в моче составляет 25% от его содержания в перфузионной среде, что в два раза ниже концентрации красителя в контрольном поражении в этот период ($p < 0,05$). Такая картина указывает на минимизацию поражения структур почечного тельца нефрона и сохра-

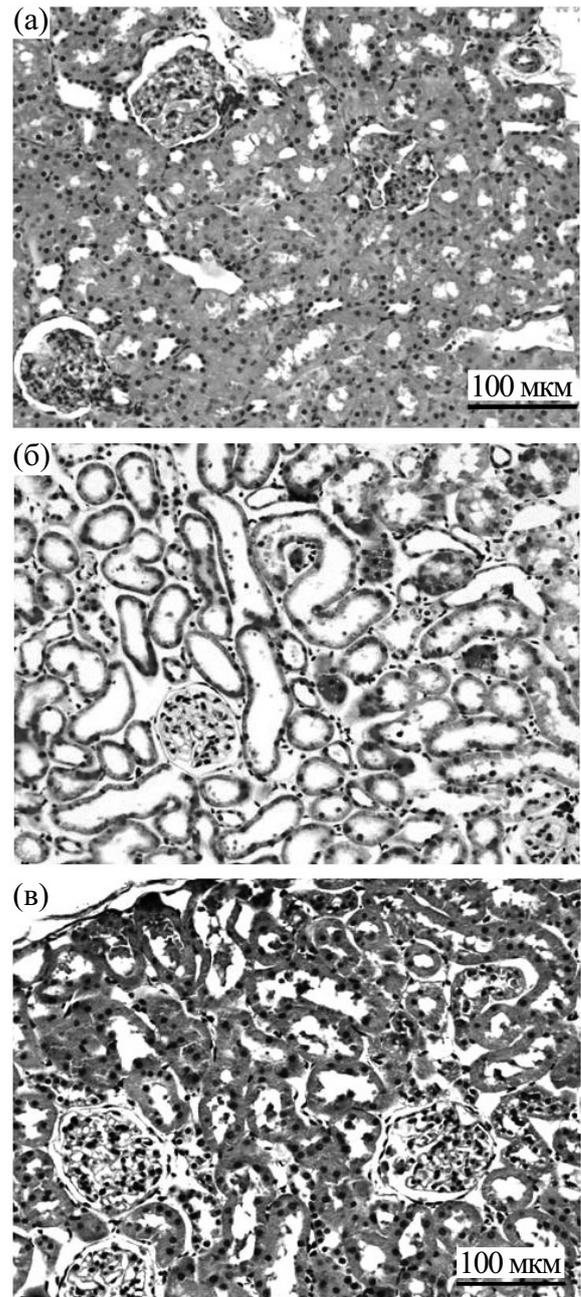


Рис. 2. Гистология изолированной почки: (а) – интактная почка; (б) – изолированная почка, ишемия – 45 мин, перфузия – 50 мин, наблюдается поражение почечной ткани с развитием дистрофии всех отделов нефрона почки; (в) – изолированная почка + Ргхб, ишемия – 45 мин, перфузия – 50 мин, наблюдается снижение поражение отделов нефрона почки. Окрашивание эозином-гематоксилином.

нение процессов ультрафильтрации при условии применения экзогенного Ргхб. Концентрация декстрана голубого в перфузионном буфере из вены достоверно не изменялась относительно контроля, как в условиях использования пероксиредоксина б, так и без него.

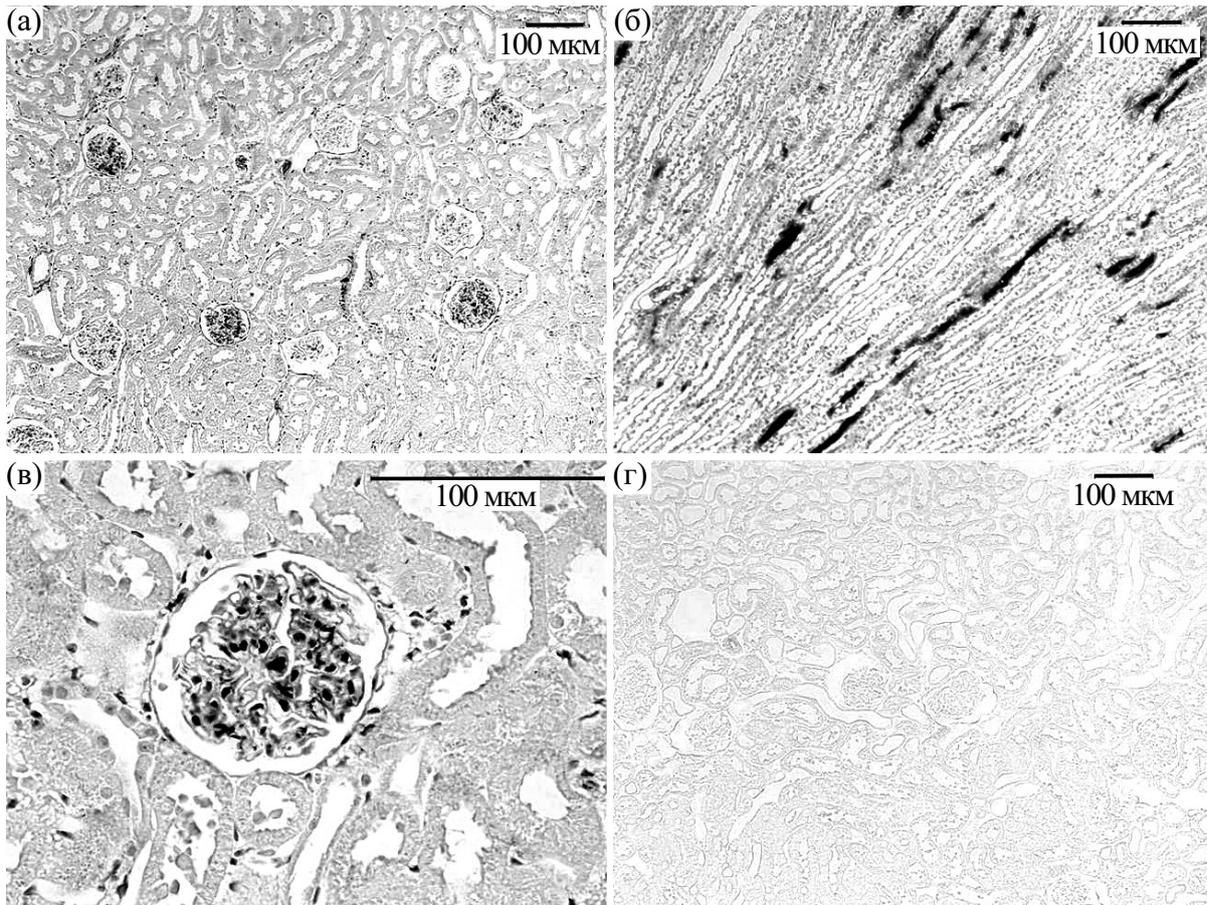


Рис. 3. Распределение экзогенного Rghb в почечной ткани в условиях изолированной перфузии: (а) и (в) – распределение Rghb корковом слое, Rghb локализован преимущественно в сосудах клубочков; (б) – распределение Rghb в мозговом слое, Rghb локализован в микрососудах, сопровождающих тонкий каналец. (а)–(в) – Положительный контроль, (г) – отрицательный контроль. Иммуногистохимический анализ с использованием кроличьих поликлональных антитела к His-tag.

Для определения сохранения функциональности почечных канальцев в перфузионный раствор вводили мочевины в концентрации 10 мМ. Данная концентрация мочевины в перфузионном буфере принята за контроль. На рис. 5 представлено изменение концентрации мочевины в моче в течение всего срока перфузии. В контрольном поражении с началом перфузии можно отметить достоверное увеличение концентрации мочевины в моче в два с половиной раза относительно контроля, что указывает на наличие функционирования систем транспорта мочевины в канальцах на этом этапе. Эта система транспорта обеспечивает реабсорбцию мочевины в кровь и ее возврат обратно в каналы. Однако уже через 10 мин перфузии отмечается резкий спад уровня мочевины в моче в сторону контрольных значений. Это может указывать на быстроту поражения структуры большей части почечных канальцев коркового и мозгового слоя и, как следствие, на отсутствие

процессов реабсорбции мочевины в кровь и ее возврата обратно в каналы.

При использовании Rghb концентрация мочевины в моче на начальном этапе перфузии достоверно возрастает в пять с половиной раз относительно контроля, что отражает активный процесс реабсорбции мочевины в кровь и ее возврат обратно в интактные каналы. К 30-й минуте перфузии можно отметить постепенное снижение уровня мочевины в моче, по сравнению с контрольным поражением, что, вероятно, указывает на торможение процессов поражения канальцев нефрона при использовании Rghb. Только через 40 мин перфузии активные процессы реабсорбции мочевины в каналах прекращаются, а уровень этого метаболита падает до контрольных значений и выходит на плато.

Концентрация мочевины в перфузионном буфере из вены достоверно не изменялась относительно контроля, как в условиях использования пероксиредоксина б, так и без него.

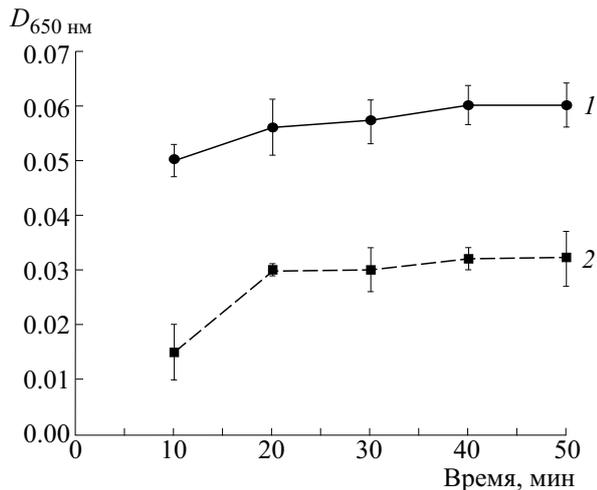


Рис. 4. Изменение концентрации красителя декстрана голубого в моче при перфузии изолированной почки: 1 – изолированная почка, ишемия – 45 мин, перфузия – 50 мин, $N = 5$; 2 – изолированная почка + Rгх6, ишемия – 45 мин, перфузия – 50 мин, $N = 5$. Краситель введен в перфузионный раствор ($D_{650} = 0.12$). К концу перфузионного периода в случае использования Rгх6 концентрация красителя в моче в два раза ниже концентрации красителя в контрольном поражении в этот период ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ишемически-реперфузионное поражение является основной причиной первичной дисфункции трансплантата и снижения его жизнеспособности. Особенно это актуально для органов, полученных от субоптимальных доноров, так как эти органы имеют низкую толерантность к ишемически-реперфузионному поражению [4–6]. Для предотвращения ишемически-реперфузионного поражения органов, полученных от субоптимальных доноров, используют перфузионное кондиционирование с использованием аппаратной перфузии взамен статической холодной консервации [16].

Основная цель применения аппаратной перфузии органов, как в эксперименте, так и в клинике – стремление улучшить состояние донорского органа перед трансплантацией [18]. Современные консервационные растворы, используемые для перфузионного кондиционирования, должны обеспечивать защиту трансплантата от отека, служить буфером для поддержания баланса pH, нести энергетические субстраты для жизнедеятельности клеток, а также обеспечивать защиту от ишемически-реперфузионного поражения [17, 19]. В настоящее время к наиболее популярным консервирующим растворам относят Евро-Коллинз, кустодиол, раствор Бельзера. Часто в практике использования аппаратной перфузии практикуются фармакологические приемы для модификации перфузионных сред. Было по-

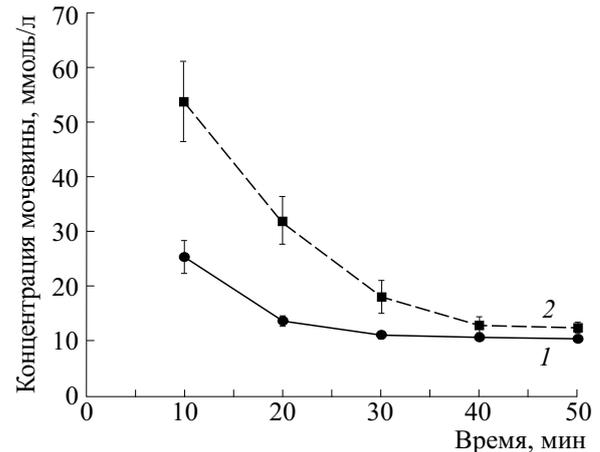


Рис. 5. Изменение концентрации мочевины в моче при перфузии изолированной почки: 1 – изолированная почка, ишемия – 45 мин, перфузия – 50 мин, $N = 5$; 2 – изолированная почка + Rгх6, ишемия – 45 мин, перфузия – 50 мин, $N = 5$. Мочевина введена в перфузионный раствор (10 мМ). При использовании Rгх6 концентрация мочевины в моче на начальном этапе перфузии достоверно возрастает в 5.5 раза относительно контроля, что отражает активный процесс реабсорбции мочевины в кровь и ее возврат обратно в интактные каналы.

казано, что внесение простагландина E1 в состав консервирующего раствора Бельзера снижает риск возникновения отсроченной функции трансплантата от доноров с расширенными критериями [20]. Использование малых доз NO, NOS-ингибиторов в сочетании с ингибиторами эндотелиальной NO-синтазы при аппаратной перфузии донорских почек достоверно уменьшает перфузионное сопротивление и уменьшает кислородную потребность почечной ткани [21]. В работе [22] было показано, что модификация перфузионной среды Бельзера мезенхимальными стволовыми клетками улучшает показатели жизнеспособности изолированной почки и сохраняет ферментативный механизм, защищающий клетку от ишемически-реперфузионного поражения при аппаратной перфузии.

Среди перфузионных сред наибольшей популярностью пользуется раствора Бельзера для холодной консервации. Его основное преимущество состоит в наличии в составе антиоксидантных агентов глутатиона и аллопуринола для снижения процессов свободнорадикального окисления [17].

К настоящему времени общепринято, что одним из основных факторов, определяющих поражение органа при ишемически-реперфузионном поражении, является окислительный стресс. В этом случае для его нейтрализации предлагается применение экзогенных антиоксидантов. В настоящей работе для защиты от свободноради-

кального окисления при ишемии—реперфузии использовали мощный фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6.

В нашем исследовании мы используем с некоторыми изменениями модель, предложенную в работе [14]. Принципиальное отличие нашей модели в том, что изолированная почка подвергается ишемически-реперфузионному поражению. Период ишемии довольно длительный и составляет 45 мин. Такой срок выбран в соответствии с данными о том, что необратимое повреждение эпителиальных клеток нефрона почки начинается с 60-й минуты тепловой ишемии. На этих сроках происходит истощение пула АТФ, что приводит к дисфункции важнейших ферментативных систем и многочисленных белков-транспортёров в клетках канальцевого эпителия. Следствием этого оказываются нарушение регуляции клеточного объема, набухание цитоплазмы и разрыв клеточной мембраны. Вторым существенным фактором ишемического повреждения клеток нефрона — нарушение метаболизма внутриклеточного кальция, происходящее вследствие прекращения работы Са-АТФаз в плазматической мембране и в мембранах эндоплазматической сети [23].

Для защиты изолированного органа от повреждающего действия ишемии—реперфузии был использован экзогенный фермент-антиоксидант Ргх6. В норме в почечной ткани был выявлен эндогенный пул пероксиредоксинов и описан характер их распределения по структурам нефрона [24, 25]. Так, для эндогенного Ргх6 характерна локализация в трубчатых сегментах нефрона, преимущественно в проксимальном и тонком канальцах. При ишемически-реперфузионном поражении именно в этих структурах наблюдается усиление экспрессии данного белка [25]. В настоящей работе было показано, что при перфузии изолированной почки экзогенным Ргх6 белок распределяется по сосудистым структурам всего периметра органа. В корковом слое почек экзогенный Ргх6 локализуется преимущественно в сосудах почечных клубочков. В мозговом слое пероксиредоксин 6 локализован в сосудах, сопровождающих тонкий каналец. В просвете тонкого канальца и капсуле почечного тельца экзогенный Ргх6 не обнаруживается. Таким образом, наблюдается резкое повышение содержания Ргх6 в сосудистых структурах.

Стоит особо отметить, что Ргх6 в составе перфузионного раствора вводится локально в изолированную почку с началом ишемии; на этапе перфузии Ргх6 в перфузионном буфере отсутствует. Таким образом, белок находится в ткани почки в течение всего периода ишемии и на начальном этапе перфузии.

Ргх6 не оказывает влияния на изменение динамики перфузионного давления. Увеличение давления до 140 мм рт. ст. в начале перфузионного периода, по-видимому, связано с вазоконстрикцией почечной артерии. После периода стабилизации давление выходит на плато со значением 110 мм рт. ст. В то же время наблюдалось снижение скорости потока мочи почти в три раза (до 0.01 мл/мин). В литературе отмечено, что значение менее 0.03 мл/мл в модели изолированной перфузии почки не соответствует требованиям для нормальной скорости клубочковой фильтрации [26]. Стоит отметить, что эти данные представлены для модели без периода ишемии. В нашей модели присутствует продолжительный период ишемии, что, вероятно, и приводит к смещению этого показателя на более низкие значения. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

В условиях использования Ргх6 было выявлено снижение степени поражения почечных структур в модели перфузии изолированной почки. Это выражалось, прежде всего, в уменьшении количества пораженных почечных телец. Стоит обратить внимание, что при введении экзогенного Ргх6 в изолированную почку он преимущественно локализуется в микрососудистых структурах почечного тельца. Таким образом, экзогенный Ргх6 попадает в те места, где в случае окислительного стресса наблюдается максимальное разрушение клеток, а именно в микрососудистые структуры. С другой стороны, отмечено снижение повреждения проксимального и тонкого канальца, с сохранением щеточной каемки эпителиоцитов, однако экзогенный Ргх6 не обнаружен в этих структурах. Снижение поражения трубчатых структур можно объяснить наличием в этих местах пула эндогенного Ргх6, уровень экспрессии которого усиливается при ишемически-реперфузионном поражении [25].

Одной из главных функций нефрона является ультрафильтрация плазмы крови в полость капсулы клубочка через эндотелиальный фильтр, образованный фенестрами и ножками подоцитов. Через фенестры эндотелиальных клеток легко проходят вода и низкомолекулярные водорастворимые вещества, а размер «фильтрационных щелей» подоцитов составляет 20–50 нм [27]. Соответственно при введении в перфузионный раствор декстрана голубого с молекулярной массой 2000 кДа не должно происходить его появления в моче при условии отсутствия поражения эндотелиального фильтра клубочка. Было показано, что при перфузии изолированной почки раствором, содержащим декстран голубой, уже через 10 мин в моче отмечено появление красителя. Такая картина объясняется результатами морфологических исследований и указывает на развитие поврежденный структур почечного тельца уже с первых ми-

нут перфузии. Выраженные повреждения почечного тельца приводят в итоге к поражению базальной мембраны клубочков. Следствием этого процесса является нарушение фильтрационных возможностей сосудистого клубочка, что и приводит к появлению красителя в моче. При использовании Ргхб также наблюдается появление в моче декстрана голубого, однако стоит обратить внимание на его динамику. Так, на начальном этапе перфузии его концентрация в моче в 3.3 раз ниже, чем при контрольном поражении на тех же сроках. К концу перфузионного периода в случае использования Ргхб концентрация красителя в моче в два раза ниже концентрации красителя в контрольном поражении в этот период. Такая картина указывает на снижение поражения структур почечного тельца и сохранение процессов ультрафильтрации при условии применения Ргхб. Кроме того, результаты морфологического исследования подтверждают факт снижения поражения структур почечного клубочка при использовании Ргхб. Стоит отметить, что изменение концентрации красителя в моче не пропорционально количеству пораженных клубочков.

Основная функция для канальцев нефрона – вернуть ультрафильтрат в общее сосудистое русло и оставить в моче токсические продукты метаболизма, избыток воды и электролитов. Главным токсический метаболит, который выводится почками с мочой, – мочевина [27]. В контрольном поражении только на начальных этапах перфузии можно отметить увеличение концентрации мочевины в моче в два с половиной раза. Уже через 10 мин перфузии наблюдается резкий спад в концентрации этого метаболита. Это может указывать на быстроту поражения структуры большей части почечных канальцев коркового и мозгового слоя и, как следствие, на отсутствие процессов реабсорбции мочевины в кровь и ее возврата обратно в каналы. В связи с тем, что основные места, ответственные за транспорт мочевины, – проксимальный каналец и тонкий сегмент восходящей части петли Генгле [27], можно говорить о поражении именно этих структур канальца. Кроме того, при морфологическом исследовании было отмечено поражение именно проксимальных канальцев – места, где происходит активный процесс реабсорбции мочевины в почечную стому.

При использовании Ргхб наблюдается совершенно другая картина в показателях концентрации мочевины в моче. Во-первых, на начальных этапах перфузии происходит значительный рост концентрации этого метаболита в моче, что напрямую указывает на наличие процессов транспорта мочевины через канальцы. Во-вторых, в течение перфузии наблюдается постепенный спад концентрации мочевины по сравнению с резким падением концентрации мочевины в контрольном

поражении. Это указывает на торможение процессов поражения при использовании экзогенного Ргхб. В-третьих, выравнивание концентраций мочевины в перфузионном растворе и моче происходит только на последнем этапе перфузии (40 мин). На этом этапе уровень мочевины падает до контрольных значений и выходит на плато, что указывает на прекращение активных процессов транспорта мочевины через канальцы. При морфологическом исследовании было показано, что при использовании Ргхб наблюдается снижение поражения общей структурной организации трубчатых структур нефрона: проксимальных и тонких канальцев. Именно эти структуры являются основными местами, ответственными за транспорт мочевины [27]. Стоит, однако, отметить, что изменение транспорта мочевины в канальцах может быть не связано напрямую с повреждением этих структур, однако полученные нами морфологические данные говорят о существенном вкладе именно этого процесса в нарушение процесса реабсорбции мочевины в кровь и ее возврат обратно в каналы.

Ранее было показано, что протекторные эффекты пероксиредоксина б связаны с его пероксидазной активностью, которая позволяет нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода, образующихся при ишемически-реперфузионном поражении органов [11, 15]. В частности, мутантный пероксиредоксин б, не обладающий пероксидазной активностью, практически не проявлял протекторных свойств при ишемически-реперфузионном поражении почки мыши [12]. В настоящем исследовании был показан протекторный эффект Ргхб на изолированной почке, что, по-видимому, связано именно с пероксидазной активностью белка.

Было показано, что введение Ргхб в составе перфузионного раствора в изолированную почку с началом ишемии позволяет на последующем этапе перфузии изолированного органа снизить поражение структур нефрона и сохранить морфофункциональное состояние почечных телец и канальцев. Результаты, полученные в работе, указывают на перспективность использования экзогенных пероксиредоксинов для сохранения структуры и функциональной активности почечного трансплантата при ишемически-реперфузионном синдроме. Кроме этого, экзогенные пероксиредоксины могут быть включены в состав известных перфузионных растворов в качестве мощного антиоксидантного агента для снижения процессов свободнорадикального окисления.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программой фундаментальных исследований

Президиума РАН «Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей, 1986». Основным документом, регламентирующим проведение настоящего исследования, являлось «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. J. Chang, H. D. Mahanty, N. L. Ascher, et al., *Am. J. Transplantol.* **3** (10), 1259 (2003).
- G. Kootstra, *Transplantation* **63** (7), 917 (1997).
- A. I. Sanchez-Fructuoso, D. Prats, et al., *J. Nephrol.* **16** (3), 387 (2003).
- С. Ф. Багненко, Ю. Г. Мойсюк, А. Е. Скворцов и др., *Вестн. трансплантологии и искусственных органов* **11** (3), 17 (2009).
- D. H. Koo and S. V. Fuggle, *Transpl. Rev.* **14** (2), 210 (2000).
- B. M. Stubenitsky, M. H. Booster, and A. P. Nidersting, *Transpl. Int.* **12**, 83 (1999).
- E. V. Karaduleva, E. K. Mubarakshina, M. G. Sharapov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **160** (5), 639 (2016).
- В. И. Новоселов, Н. К. Равин, М. Г. Шарапов и др., *Биофизика* **56** (5), 873 (2011).
- А. Г. Волкова, М. Г. Шарапов, В. К. Равин и др., *Пульмонология* **2**, 84 (2014).
- O. A. Palutina, M. G. Sharapov, A. A. Temnov, et al., *Bull. Exp. Biol. Med.* **160**, 322 (2015).
- М. Г. Шарапов, А. Е. Гордеева, Р. Г. Гончаров и др., *Биофизика* **62** (6), 998 (2017).
- R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.* **378** (2), 319 (2019).
- М. Г. Шарапов, В. И. Новоселов и В. К. Равин, *Молекуляр. биология* **43** (3), 505 (2009).
- J. Czogalla, F. Schweda, and J. Loffing, *J. Vis. Exp.* **117**, e54712 (2016). DOI: 10.3791/54712
- A. E. Gordeeva, A. A. Temnov, A. A. Charnagalov, et al., *Dig. Dis. Sci.* **60** (12) 3610 (2015).
- Т. В. Абрашова, Я. А. Гушин и М. А. Ковалева, *Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник* (ЛЕМА, СПб., 2013).
- А. М. Федорук, *Новости хирургии* **26** (2), 215 (2018).
- S. F. Bagnenko, K. Senchik, A. Skvortsov, et al., *Vestn. khirurgii* **169** (2), 113 (2010).
- R. Anaya-Prado and J. A. Delgado-Vázquez, *Curr. Opin. Organ. Transplantol.* **13** (2) 129 (2008).
- M. R. Maximilian, M. Ph. Polyak, B. S. Ben OMar Arington, et al., *J. Surg. Res.* **85** (1) 17 (1999).
- F. A. Gage and Y. Vodovotz, *Nitric Oxide* **9** (3) 141 (2003).
- M. Gregorini, V. Corradetti, E. Pattonieri, et al., *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 3381 (2017).
- L. F. Tirapelli, D. F. Barione, B. F. Trazzi, et al., *Transplantol. Proc.* **41**, 4083 (2009)
- S.V. Novoselov, I. V. Peshenko, V. I. Popov, et al., *J. Cell Tissue Res.* **298**, 471 (1999).
- J. R. Godoy, S. Oesteritz, E. M. Hanschmann, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 552 (2011).
- D. R. Taft, *Curr. Drug Discov. Technol.* **1**, 97 (2004).
- И. А. Савин и А. С. Горячев, *Водно-электролитные нарушения в нейрореанимации* (М., 2015).

The Effect of Exogenous Peroxiredoxin 6 on Functional Parameters of Isolated Rat Kidney

A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, V.A. Evdokimov, V.I. Novoselov, and E.E. Fesenko

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The purpose of the study was to investigate the protective effects of exogenous peroxiredoxins on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. This study was conducted using ex vivo isolated, perfused rat kidney model. Recombinant peroxiredoxin 6 was injected directly into the perfusion buffer. Blue Dextran of high molecular weight (2000 kDa) and urea were added to the perfusion buffer to evaluate renal function of isolated kidney. It was shown that in isolated rat kidney cortex exogenous peroxiredoxin 6 was localized in glomerular vessels within the kidneys; in the medulla it was found in the microvessels which surrounded the thin-walled tubules. It was shown that peroxiredoxin 6 has the capacity to lower a degree of damage to nephron structures by a factor of 2 as compared to control damage, thereby ensuring the maintenance of ultrafiltration processes. A reduction in glomerular damage leads to a 2-fold decrease in Blue Dextran concentration in urine as compared to control damage at the end of the perfusion period. When tubular structures are less affected by injury, it implies that urea transport is active during perfusion. The present study thus indicates that the presence of peroxiredoxin 6 in the perfusion buffer contributes to a less amount of damage to nephron structures facilitating the maintenance of the morphofunctional state of renal glomeruli and tubules.

Keywords: isolated kidney, nephrons, peroxiredoxins, ischemia—reperfusion

УДК 577.15

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ХИМЕРНОГО ФЕРМЕНТА-АНТИОКСИДАНТА PSH ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧЕК

© 2020 г. Р.Г. Гончаров*, **, Г.И. Фильков**, А.В. Трофименко**, В.В. Бояринцев**,
В.И. Новоселов*, **, М.Г. Шарапов*, **

*Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

**Московский физико-технический институт,
141700, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 05.02.2020 г.

Наиболее опасным этапом ишемически-реперфузионного поражения является стремительный рост концентрации свободных радикалов и активных форм кислорода на стадии реперфузии. Лавинообразный рост уровня активных форм кислорода и вторичных продуктов свободнорадикального окисления биологических макромолекул приводит к развитию окислительного стресса. Применение экзогенных антиоксидантов позволяет снизить концентрацию активных форм кислорода в пораженных тканях, подавить или скорректировать течение окислительного стресса, тем самым существенно снизить тяжесть ишемически-реперфузионного поражения. Среди большого списка патологий, вызванных ишемией–реперфузией, одной из наиболее социально значимых является ишемическая острая почечная недостаточность. На животной модели билатерального ишемически-реперфузионного поражения почек был показан нефропротекторный эффект химерного фермента-антиоксиданта PSH, состоящего из пероксиредоксина 6 человека и Mn-содержащей супероксиддисмутазы *Escherichia coli*. Благодаря наличию супероксиддисмутазной и пероксидазной активностей рекомбинантный химерный белок PSH способен нейтрализовать максимально широкий спектр активных форм кислорода. С помощью гистологических, биохимических и молекулярно-биологических методов показано, что предварительное введение химерного белка PSH перед ишемией–реперфузией способствует существенному снижению степени поражения тканей почек и приводит к быстрой нормализации их структурно-функционального состояния. Кроме того, введение фермента PSH увеличивает более чем в 1,5 раза выживаемость экспериментальных животных. Применение рекомбинантного химерного фермента PSH может быть эффективным подходом в предупреждении и лечении ишемически-реперфузионных поражений почек, а также для сохранения изолированной почки при трансплантации.

Ключевые слова: пероксиредоксин, супероксиддисмутаза, химерные ферменты, окислительный стресс, ишемия–реперфузия, почки.

DOI: 10.31857/S0006302920020180

В настоящее время хорошо известно, что ишемически-реперфузионные (И-Р) поражения являются основным фактором развития многих патологических состояний организма, которые связаны с нарушением нормального кровотока. К ним относятся такие заболевания, как шоковое поражение органов, ишемический инсульт, инфаркт миокарда, острая почечная недостаточ-

ность и др. [1, 2]. Кроме этого, многие лечебно-диагностические вмешательства связаны с И-Р-повреждением. В частности, при трансплантационной хирургии органы подвергаются частично или полному прекращению кровотока (ишемии) различной продолжительности, с последующим восстановлением кровотока – реперфузией. В ходе И-Р происходит развитие сложных взаимосвязанных патобиохимических процессов. На сегодняшний день хорошо известно, что ключевую роль в патогенезе И-Р-поражений играет окислительный стресс, который вызван гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), способных повреждать структурно-функцио-

Сокращения: И-Р – ишемия–реперфузия, АФК – активные формы кислорода, PSH – Prx6-MnSOD-His-tag, химерный белок, состоящий из пероксиредоксина 6 человека и Mn-содержащей супероксиддисмутазы, ПЦР – полимеразная цепная реакция, МДА – малоновый диальдегид.

нальную целостность всех метаболически активных тканей [3, 4]. В современной терапии И-Р-повреждений существует несколько подходов. Во-первых, это использование ишемического preconditionирования, вызванного кратковременным пережатием питающих сосудов, или фармакологических препаратов, вызывающих гипоксию, разобщение дыхания в митохондриях и др. [5]. Ишемическое preconditionирование способствует росту уровня АФК и компенсаторному росту уровня эндогенных антиоксидантов в тканях благодаря стимуляции различных транскрипционных факторов NIFs, NRF-2 и др., способных регулировать уровень экспрессии ферментов-антиоксидантов [6, 7]. Несомненно, ишемическое preconditionирование обладает рядом преимуществ, однако его клиническое использование ограничено из-за сложности прогноза оптимального времени ишемического preconditionирования для достижения эффективной защиты органа от И-Р-повреждения [8]. В этой связи более перспективным подходом в лечении И-Р-поражений является применение экзогенных антиоксидантов, которые нейтрализуют АФК и тем самым подавляют первопричину И-Р-поражения. В антиоксидантной терапии И-Р-поражений особую роль могут играть ферменты-антиоксиданты, так как их эффективность значительно превышает таковую для низкомолекулярных антиоксидантов [9]. Среди известных ферментов-антиоксидантов особый интерес представляют пероксиредоксины, которые способны нейтрализовать широкий спектр АФК как органической, так и неорганической природы, поэтому применение этих ферментов представляется наиболее перспективным подходом в предупреждении и лечении заболеваний, вызванных И-Р-поражениями. Так, нами была показана высокая терапевтическая эффективность рекомбинантного P_{rx6} при лечении травм кожи [10], ожогов верхних дыхательных путей [11], И-Р-поражении кишечника [12] и почек [13], а также был обнаружен радиопротекторный эффект этого фермента [14, 15]. Важно отметить, что среди семейства пероксиредоксинов P_{rx6} характеризуется наиболее широким спектром нейтрализуемых гидропероксидов, а также обладает активностью фосфолипазы A₂ (aiPLA), которая играет важную роль в межклеточной сигнализации [16, 17]. Для расширения спектра нейтрализуемых АФК и усиления терапевтических свойств на основе P_{rx6} человека и Mn-содержащей супероксиддисмутазы *E. coli* был создан химерный белок PSH (P_{rx6}-MnSOD-His-tag), проявляющий две антиоксидантные активности – супероксиддисмутазную и пероксидазную [18]. В настоящей работе проведено исследование нефропротекторных свойств химерного белка PSH на модели билатеральной И-Р-почек мыши. Полученные результаты могут

представлять интерес при разработке нового класса терапевтического препаратов антиоксидантного действия, для предупреждения/лечения патологий, вызванных окислительным стрессом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение ферментов. Генно-инженерная конструкция, кодирующая фермент PSH, была получена и экспрессирована ранее в клетках *E. coli* BL21(DE3) [18]. Рекомбинантный белок PSH содержит на карбоксильном конце His-tag, поэтому очистку фермента проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с рекомендациями производителя [18]. Согласно гель-электрофорезу в 10%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, чистота полученного химерного фермента PSH составляла не менее 95%.

Определение пероксидазной активности. Пероксидазную активность фермента в отношении пероксида водорода (H₂O₂) и *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BOOH) определяли по методике, подробно описанной нами ранее [19]. Пероксидазная активность рекомбинантного P_{rx6} в составе PSH составила 200 ± 30 нмоль/мин/мг (в отношении H₂O₂) и 90 ± 15 нмоль/мин/мг (в отношении *t*-BOOH).

Определение активности супероксиддисмутазы. Определение супероксиддисмутазной активности Mn-содержащей супероксиддисмутазы (*E. coli*) в составе химерного фермента PSH проводили с помощью готового набора реактивов – Superoxide Dismutase Assay Kit (Calbiochem, США), в соответствии с инструкцией производителя. Активность Mn-содержащей супероксиддисмутазы (*E. coli*) в составе PSH составила 17 ед./мл.

Животные. Использовали мышей-самцов линии *BALB/c* восьминедельного возраста с массой тела 25–30 г (виварий ИБК РАН, Пушкино). Животным обеспечивали свободный и неограниченный доступ к питьевой воде и корму, однако в течение 24 ч до хирургического вмешательства животные голодали, но получали воду.

Модель ишемически-реперфузионного поражения почек мыши. Анестезию проводили путем введения смеси Zoletil-100 (Virbac Sante Animale, Франция) и Rometar-20 (Bioveta, Чехия) внутримышечно в 0,9% растворе NaCl в концентрациях 40 и 7 мг соответственно на 1 г веса мыши. Действие анестезии длилось в течение полутора-двух часов. Операцию на животных проводили согласно процедуре, описанной ранее [20], с небольшими модификациями. После начала действия анестезии животным делали небольшие латеральные надрезы кожных и мышечных слоев с двух сторон

тела, открывая тем самым доступ к почечным артериям и венам. Далее с помощью кровоостанавливающих зажимов проводили одновременное пережатие левых и правых почечных артерий и вен, что приводило к блокированию притока и оттока крови к тканям почек, т. е. ишемии. Внешним признаком начала ишемии является изменение цвета почки с бледно-розового до темно-пурпурного. Ишемия длилась в течение 30 мин, после чего снимали зажимы для восстановления притока и оттока крови (стадия реперфузии). Внешним признаком начала реперфузии является изменение цвета почек с темно-пурпурного до бледно-красного. Латеральные разрезы зашивали и обрабатывали антисептиком. После операции животные были обеспечены кормом и водой *ad libitum*. Спустя 24 и 72 ч животных умерщвляли декапитацией и проводили забор почек, которые делили на три равные части согласно схеме, описанной в работе [21].

Для проверки терапевтического действия раствор рекомбинантного PSH вводили через хвостовую вену в конечной концентрации 20 мкг/г массы мыши за 15 мин до начала ишемии. Подбор способа введения и концентрации раствора белка осуществляли на основе предыдущих исследований [13–15, 22].

Гистологический анализ почечной ткани. Ткани почки фиксировали в 10%-м растворе формальдегида, затем образцы дегидратировали в повышающемся градиенте этанола и заключали в парафин. С помощью микротомы (Thermo Electron Corporation, США) готовили парафиновые срезы толщиной 3 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Biovitrum, Россия). Гистологический анализ проводили с использованием микроскопа Leica DM6000 (Leica, Германия). Для каждого гистологического образца проводили анализ 15–20 полей трех различных срезов при увеличении 200–500×.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Для оценки времени циркуляции экзогенного PSH в крови животного 1 мг PSH вводили внутривенно трем самцам мышей *BALB/c* с последующим отбором крови (~ 50 мкл) из хвостовой вены через 10, 60, 120 и 240 мин для анализа изменения содержания PSH в системном кровотоке. Экзогенный рекомбинантный PSH содержит метку His-tag на С-конце, которая позволяет специфически отслеживать присутствие рекомбинантного белка. Для определения уровня индукции каспазы-3 в тканях почек проводили отбор ~ 40 мг ткани у контрольных и опытных животных до И-Р-поражения и спустя 24–72 ч после И-Р-поражения. Образцы белков почек и сыворотки крови проводили в денатурирующих условиях (в присутствии SDS) по стандартной методике Лэммли на оборудовании Mini Vertical Unit (Amersham,

США). В работе использовали 5%-й концентрирующий и 10%-й разделяющий полиакриламидные гели. Белки, разделенные в полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм Hybond-C (Amersham, США) с помощью прибора для полусухого переноса TRANS-BLOT SD (Bio-Rad, США). Были использованы следующие первичные антитела: моноклональные антитела кролика против His-tag (1:1000, #12698, Cell Signaling technology, США); моноклональные антитела кролика против Caspase 3 (1:1000, 9H19L2, Thermo Fisher Scientific, США); антитела кролика против Actin-β (1 : 1000, #4967, Cell Signaling, США). Использовали вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:1000, P-GAR Iss, ИМТЕК, Россия). Все процедуры в процессе иммуноблоттинга проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Белки выявляли, используя диаминобензидин (Amresco, США), денситометрический анализ осуществляли, применяя программное обеспечение ImageJ (www.imagej.nih.gov). Данные были нормированы относительно β-актина.

Анализ уровня экспрессии генов в почечной ткани. Уровень экспрессии генов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Общую РНК из образцов ткани получали с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия). Качество РНК оценивали элетрофоретически в 2%-м агарозном геле. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000c (Thermo Fisher Scientific, США). Для обратной транскрипции использовали по 2 мкг общей РНК, обратную транскриптазу MMLV и стандартный олигонуклеотид dT₁₅ («Евроген», Россия). Полученную кДНК использовали для ПЦР с генспецифическими олигонуклеотидами (табл. 1).

ПЦР в реальном времени проводили с помощью аплификатора DTLite («ДНК-Технология», Россия) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), где в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя используется SYBR Green II. Режим ПЦР: (1) – «горячий старт» при 95°C, 5 мин; (2) – денатурация при 95°C, 15 с; (3) отжиг праймеров и синтез ДНК при 60°C, 30 с. Этапы (2) и (3) повторяли 40 раз. Определение значений порогового цикла – *Ct* – проводили с помощью программного обеспечения DTmaster (ДНК-Технология, Россия). Нормирование проводили относительно гена цитоскелетного бета-актина (*Actb*). Расчет $\Delta\Delta Ct$ проводили по формуле $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (Контроль) – ΔCt (опыт); каждое значение ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta Ct = Ct$ (исследуемый ген) – Ct (*Actb*) [23].

Таблица 1. Ген-специфические олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени

№	Наименование	Последовательность олигонуклеотида 5' – 3' (F+R)	Размер, п.н.	# GenBank
1	bAct	CCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCC CACCAGACAGCACTGTGTTGGCA	115	NM_007393.4
2	CASP3	AAGGAGCAGCTTTGTGTGTG GAAGAGTTTCCGGCTTTCCAG	145	NM_009810
3	eNOS	GAACCTGAGGGTGCCCAG TCCGATTCAACAGTGTCTCCT	71	NM_021838.2
4	iNOS	GCTACACTTCCAACGCAACA CATGGTGAACACGTTCTTGG	115	NM_012611.3
5	IL-6	TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC TTGGTCCCTTAGCCACTCCTTC	76	NM_031168
6	IL-18	GTGTTCCAGGACACAACAAG CTTCCTTTTGCCAAGCAAGA	74	NM_008360.1
7	NF-κB	CCACGCTCAGCTTGTGAGGGAT GGCCAAGTGCAGAGGTGTCTGAT	106	NM_008689
8	KIM-1	CTCGCTGGAAAAGAAGTG CCGTCCAGGAGTTCAGAGG	240	NM_010902

Определение уровня малонового диальдегида в тканях почек. Определение уровня малонового диальдегида (МДА) проводили по стандартной методике с использованием тиобарбитуровой кислоты. К 20–30 мг ткани почек последовательно добавляли 450 мкл 1% H_3PO_4 и 150 мкл 0,8% тиобарбитуровой кислоты и гомогенизировали с использованием тефлонового пестика. Затем смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения добавляли 380 мкл *n*-бутанола и тщательно перемешивали. Отделяли слой *n*-бутанола путем центрифугирования. Оптическую плотность водной фракции определяли с помощью прибора Multiskan (Labsystem Plus, Финляндия), длина волны 546 нм.

Биохимический анализ крови. Отбор крови осуществляли у контрольных и опытных животных, который проводили до И-Р-поражения и спустя 24–72 ч после И-Р-поражения почек. Биохимический анализ крови проводили на биохимическом экспресс-анализаторе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическая обработка. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 11 (Systat Software Inc, США). Результаты выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение. Внутригрупповые статистические различия определяли с помощью одностороннего анализа ANOVA, а статистическую значимость между отдельными экспериментальными группами – с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента. Значение $P < 0.05$ принимали как статистически достоверное различие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка времени циркуляции рекомбинантного PSH в кровотоке животных. Для доказательства того, что терапевтический эффект PSH при И-Р-поражении почки определялся его присутствием в органах животного, с помощью иммуноблоттинга была проведена оценка изменения содержания рекомбинантного фермента PSH в сыворотке крови животных после внутривенного введения (рис. 1).

Результаты показали, что в первый час после внутривенного введения PSH в крови животного присутствует более 80% от исходного количества вводимого белка. С течением времени количество экзогенного фермента PSH в сыворотке крови животных снижается и через три часа уменьшается примерно в 1,6 раза. Таким образом, экзогенный рекомбинантный фермент PSH присутствует в крови животного в течение всего ишемического периода (30 мин) в количестве не менее 80–90%, а при последующей реперфузии, по крайней мере в течение первых четырех часов реперфузионного периода значительная часть введенного фермента циркулирует в периферической крови. Ранее было показано, что начальным периодом повреждения почек при И-Р-поражении являются первые четыре-шесть часов [24], а своего пика степень повреждений достигает спустя 24 ч после И-Р, что является хорошим критерием для оценки защитных свойств рекомбинантного фермента.

Выживаемость животных после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. На первом этапе работы была исследована выживаемость животных в течение пяти

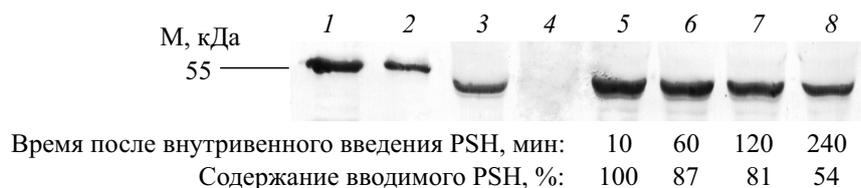


Рис. 1. Иммуноблоттинг сыворотки крови мышей после внутривенного введения PSH: 1, 2 – чистый препарат рекомбинантного PSH (500 и 100 нг соответственно); 3, 4 – плазма крови контрольных животных с добавленным к ней препарата рекомбинантного PSH; 5 – плазма крови контрольных животных, не получавших инъекцию рекомбинантного PSH; 5–8 – пробы плазмы крови мыши спустя 10, 60, 120 и 240 мин после внутривенного введения 1 мг PSH.

суток после И-Р-поражения обеих почек и предварительного введения PSH за 15 мин до начала тридцатиминутной ишемии (рис. 2).

Показано, что спустя 72–120 ч в группе с И-Р и без предварительного введения рекомбинантного фермента антиоксиданта выживаемости животных составила 20% (рис. 2). В группе с предварительным введением PSH процент выживаемости за тот же период увеличился в 1,7 раза по сравнению с И-Р-группой. Полученные результаты демонстрируют, что критическим периодом для выживания животных являются первые 72 ч после И-Р-поражения обеих почек.

Морфологический анализ почек после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Для оценки морфологических изменений в почечной ткани после И-Р и предварительного введения (за 15 мин) рекомбинантного фермента PSH перед тридцатиминутной ишемией и последующей реперфузией (24–72 ч) был проведен гистологический анализ тканей (рис. 3).

Гистологический анализ срезов ткани почек контрольной группы показал, что тридцатиминутная ишемия и последующая 24-часовая реперфузия почек мышей приводят к полнокровию интерстиция и капиллярных петель клубочков. Целостность клубочков нефрона не нарушена, однако наблюдается увеличение их размеров. В эпителии почечных канальцев, обнаружены выраженные дистрофические повреждения, с разрушением апикальных отделов эпителиоцитов. В некоторых извитых канальцах отмечен некроз и десквамация клеток канальцевого эпителия. Просвет канальцев при этом был заполнен белковым детритом (рис. 3б). Через 72 ч после восстановления кровотока в почках сохранялось умеренное полнокровие капиллярных петель клубочков. В эпителии извитых канальцев выявлена баллонная дистрофия с деструкцией апикальных отделов клеток. Отчетливая эозинофилия цитоплазмы эпителиальных клеток, вероятно, связана с массовой денатурацией белков. Расширенные просветы извитых канальцев почек были обусловлены деструктивными изменениями клеток эпителия (рис. 3д). Дистрофические изменения,

но без клеточной деструкции отмечены и в эпителии прямых канальцев.

Введение фермента PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии и последующая 24-часовая реперфузия также приводят к полнокровию капиллярных петель клубочков и интерстиции почечной ткани. Однако целостность клубочков нефрона не нарушена, хотя отмечается увеличение в размерах. Наблюдаются дистрофические и деструктивные изменения эпителия извитых и прямых канальцев (рис. 3в). Через 72 ч сохраняется полнокровие капиллярных петель клубочков и интерстиция, однако дистрофия извитых и прямых канальцев ниже, чем двумя сутками ранее. В просвете извитых канальцев наблюдается скопление белковых масс, а выстилающий их эпителий уплощен с выраженной гидропической дистрофией и умеренной деструкцией эпителиальных клеток (рис. 3е). Суммарные результаты гистологического анализа почечной ткани после И-Р и предварительного введения PSH перед И-Р представлены в табл. 2.

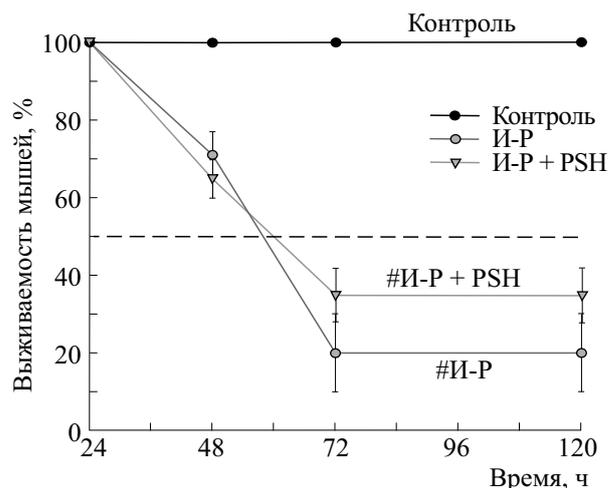


Рис. 2. Выживаемость мышей в течение пяти суток после тридцатиминутной ишемии обеих почек и последующей реперфузии, а также после предварительного введения рекомбинантного фермента PSH за 15 мин до ишемии.

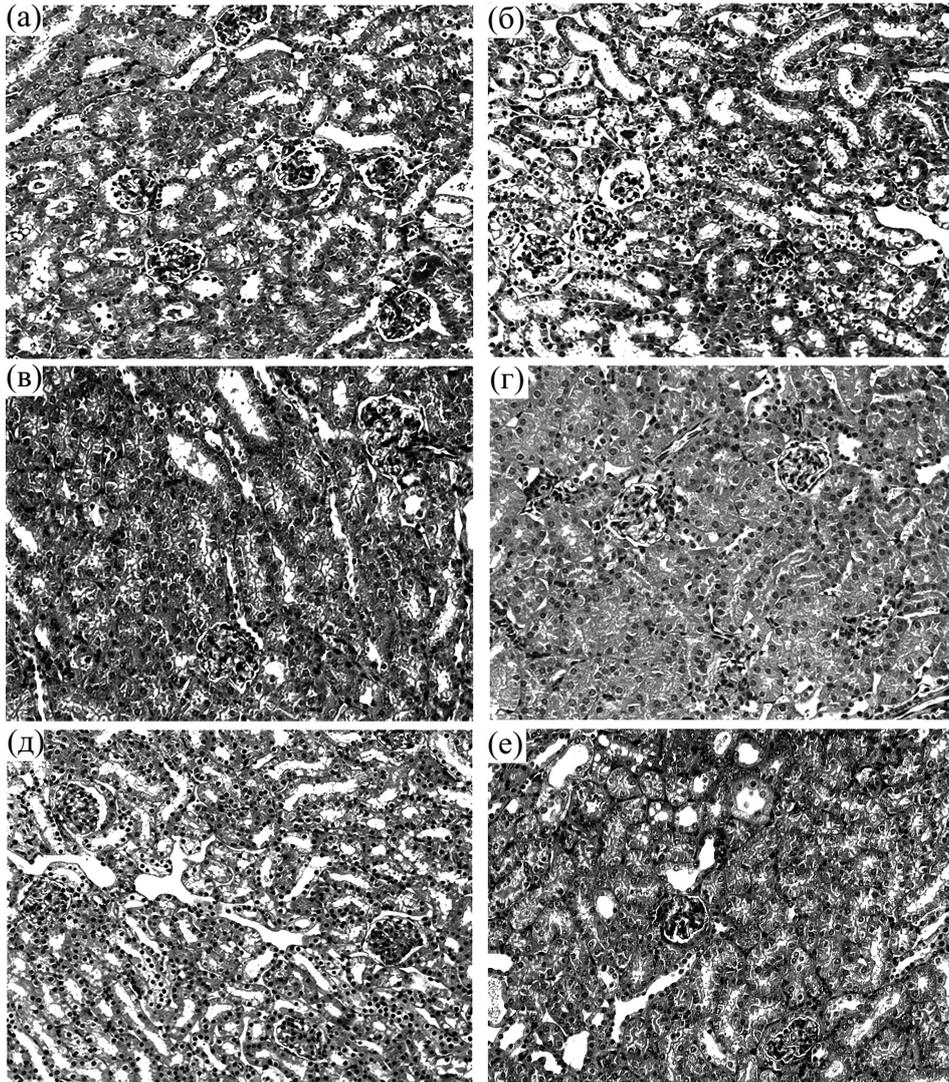


Рис. 3. Структура коркового слоя почки мыши после ишемии-реперфузии и предварительного введения рекомбинантного PSH. (а) – Интактный контроль; (б) – 30-минутная ишемия, реперфузия – 24 ч, без лечения; (в) – внутривенное введение PSH (е) за 15 мин до 30-минутной ишемии, реперфузия – 24 ч; (г) и (д) – 30-минутная ишемия, реперфузия – 72 ч, без лечения; (е) – внутривенное введение PSH (е) за 15 мин до 30-минутной ишемии, реперфузия – 72 ч. Окраска: гематоксилин–эозин; n = 10 для каждой из групп.

На основании гистологического анализа коркового слоя почки спустя 24 и 72 ч после И-Р можно заключить, что использование рекомбинантного фермента PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии по сравнению с контрольной группой И-Р без лечения снижает поражение почечной ткани, способствуя ее более быстрому восстановлению у выживших животных.

Биохимический анализ крови животных после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Важным параметром нормальной работы почек является их экскреторная функция. Общепринятыми биохимическими маркерами, позволяющими оценить нормальное функционирование почки, являются concentra-

ции мочевины и креатинина в крови [25]. Данные показатели являются важными критериями оценки терапевтической эффективности предварительного введения рекомбинантного PSH перед И-Р. Оценку уровней мочевины и креатинина в крови животных проводили в течение трех последующих суток после И-Р (табл. 3 и 4).

Спустя 24 ч после И-Р наблюдается увеличение концентрации мочевины в крови примерно в пять раз, а креатинина – более чем в шесть раз по сравнению с интактной группой (табл. 3 и 4). Аналогичный результат с использованием похожей животной модели был получен в работах других авторов [26, 27]. В группе с предварительным введением PSH концентрация мочевины в крови

Таблица 2. Оценка морфометрических параметров тканей почек после И-Р и предварительного введения химерного фермента-антиоксиданта PSH перед И-Р

Параметр	Контроль		И-Р		PSH	
	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч
Расширение капсулы Боумена	–	–	+	+	+	++
Полнокровие интерстиция	–	–	++	++	++	++
Интерстициальный инфильтрат	–	–	+	+	+	+
Застой в кровеносных сосудах	–	–	++	++	++	+
Дистрофия извитых канальцев	–	–	++	++	++	+
Дистрофия прямых канальцев	–	–	++	++	++	+
Расширение извитых канальцев	–	–	+	+	+	++
Десквамация клеток эпителия	–	–	++	++	++	+
Разрушение эпителиоцитов	–	–	++	++	++	+

Примечание. Гистологические изменения оценивались по шкале: (–) – нормальные, (+) – легкие изменения, (++) – средние изменения, (+++) – заметные изменения; $n = 10$ для каждой из групп.

Таблица 3. Концентрация мочевины в крови животных в течение трех суток после И-Р-поражения обеих почек

Группа животных	Концентрация мочевины, мг/дл		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	57 ± 9	54 ± 7	56 ± 8
И-Р	$290 \pm 40^*$	$140 \pm 10^*$	90 ± 10
И-Р + PSH	$220 \pm 30^*$	$120 \pm 10^*$	70 ± 10

Примечание. $n = 50$ для каждой из групп, * – $p < 0.05$ относительно интактного контроля.

Таблица 4. Концентрация креатинина в крови мышцы в течение трех суток после И-Р поражения обеих почек

Группа животных	Концентрация креатинина, мг/дл		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02
И-Р	$1.8 \pm 0.3^*$	$1.1 \pm 0.3^*$	$0.7 \pm 0.2^*$
И-Р + PSH	$1.55 \pm 0.2^*$	$0.7 \pm 0.2^*$	$0.6 \pm 0.1^*$

Примечание. $n = 50$ для каждой из групп, * – $p < 0.05$ относительно интактного контроля.

примерно на 25%, а креатинина – на 15–20% ниже, чем в контрольной группой без лечения. Спустя 48 ч после И-Р во всех группах отмечается заметное снижение концентрации мочевины и креатинина в крови животных на 40–50%. Через 72 ч количество мочевины в крови выживших животных во всех группах стабилизируется на значениях чуть выше физиологической нормы. Таким образом, предварительное введение рекомбинантного PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии способствует сохранению экскреторной функцию почек на протяжении трех суток реперфузионного периода у выживших животных.

Уровень малонового диальдегида в ткани почки после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Известно, что при окислительном стрессе под действием АФК происходит модификация/повреждение всех биологических макромолекул, в том числе перекисное окисление липидов мембран клеток. Одним из конечных продуктов перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид [4]. Был проведен анализ содержания МДА в тканях почек животных спустя 24 ч после И-Р и предварительного введения PSH (табл. 5).

Показано, что И-Р-поражение приводит к десятикратному увеличению концентрации МДА в

Таблица 5. Содержание малонового диальдегида в тканях почек животных после И-Р и предварительного введения фермента PSH перед И-Р

Группа животных	Концентрация МДА в ткани почки, нмоль/г
Контроль	197 ± 40
И-Р	2000 ± 300*
И-Р + PSH	600 ± 100*#

Примечание. $n = 5$ для каждой из групп, *— $p < 0.05$ относительно интактного контроля, # — И-Р.

Таблица 6. Изменение уровня экспрессии генов спустя 24 ч после И-Р-поражения относительно интактных животных

Ген	Изменение уровня экспрессии относительно контроля		
	Контроль	И-Р	И-Р + PSH
AP-1	1.0	7.5 ± 0.8	3.5 ± 0.8*#
Casp-3	1.0	4.5 ± 0.7	3.0 ± 0.5*
NRF-2	1.0	7.5 ± 0.8	2.5 ± 0.5*#
NF-κB	1.0	5.5 ± 0.7	3.5 ± 0.7*
IL-6	1.0	2.5 ± 0.8	2.5 ± 0.5*
IL-18	1.0	7.0 ± 1.0	0.7 ± 0.3#
iNOS	1.0	14.0 ± 3.0	3.0 ± 0.5*#
eNOS	1.0	22.0 ± 4.0	3.0 ± 1.0*#
KIM-1	1.0	106 ± 30	75 ± 15*

Примечание. $n = 5$ для каждой из групп, *— $p < 0.05$ относительно интактного контроля, # — И-Р.

почечной ткани в первые сутки реперфузионного периода, в то время как предварительное введение PSH снижает образование МДА в почечной ткани в 3.0–3.5 раза. Таким образом, внутривенное введение PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии снижает уровень перекисного окисления липидов в почечной ткани, что, вероятно, связано с подавлением процессов окислительно-стресса в пораженных тканях почки.

Оценка экспрессии генов в тканях почек после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Для понимания молекулярных механизмов защитного действия экзогенного PSH был проведен анализ изменения уровня экспрессии некоторых маркерных генов (табл. 1). В табл. 6 представлены данные по изменению уровня экспрессии некоторых маркерных генов в тканях почек спустя сутки после И-Р и предварительном введении PSH. Необходимо отметить, что в табл. 6 представлены данные по генам, уровень которых достоверно изменялся. Также важно отметить, что спустя 48–72 ч после И-Р значения экспрессии генов нормализуются, приближаясь к значениям у интактных животных (данные не показаны).

Молекула почечного повреждения-1 (KIM-1), гликопротеин клеточной мембраны I типа, явля-

ется общепризнанным чувствительным маркером почечного повреждения [28]. Действительно, анализ изменения уровня экспрессии KIM-1 в группах с И-Р показал его значительный рост более чем в 100 раз, что указывает на повреждения в ткани почки спустя 24 ч после тридцатиминутной ишемии. В группе с предварительным введением PSH уровень KIM-1 на 20–30% ниже, чем в контрольной группе И-Р без предварительной инъекции фермента. Это доказывает, что предварительное введение PSH перед И-Р-поражением способно уменьшать повреждение почек.

Транскрипционный фактор NRF2 является основным транскрипционным фактором, который регулирует уровень экспрессии генов антиоксидантного ответа, тем самым он играет ключевую роль в поддержании редокс гомеостаза тканей. Кроме того, NRF2 взаимодействует с другими редокс-чувствительными транскрипционными факторами NF-κB и AP-1, тем самым оказывая влияние на их транскрипционную активность и клеточные процессы, которые они регулируют [29]. Как отмечалось ранее, И-Р сопровождается лавинообразным ростом уровня АФК в пораженных тканях, что индуцирует активацию NRF2 [30]. При И-Р-поражении обеих почек мышей в контрольной группе наблюдается рост экс-

прессии NRF2 (в семь с половиной раз). Активация транскрипционного фактора NRF-2 при И-Р-поражении почек свидетельствует об увеличении уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты антиоксиданты, за счет взаимодействия с цис-регуляторным элементом ARE (antioxidant responsive element). Предварительное введение PSH перед И-Р уменьшает уровень индукции NRF-2 примерно на 30% в сравнении с контрольной группой, что доказывает нормализацию окислительно-восстановительного гомеостаза тканей по сравнению с контрольной группой И-Р без лечения.

Одним из ключевых транскрипционных факторов, участвующих в поддержании нормального гомеостаза в клетке в стрессовых условиях является транскрипционный фактор NF-κB [31]. Уровень экспрессии транскрипционного фактора NF-κB при И-Р-поражении повышен более чем в пять раз, что свидетельствует о запуске процессов регенерации клеток. На фоне повышенных значений NF-κB можно отметить заметное увеличение уровня экспрессии генов IL-6 (в два с половиной раза) и IL-18 (в семь раз), что, вероятно, свидетельствует о стимуляции иммунного ответа. Предварительное введение ферментов PSH уменьшает уровень NF-κB более, чем на 30% в сравнении с контрольной И-Р группой без лечения. Снижение уровня экспрессии NF-κB после введения PSH, возможно, связано со снижением уровня АФК в клетках почки. Было показано, что некоторые антиоксиданты (L-цистеин, N-ацетилцистеин, тиолы, витамин E и его производные) способны блокировать активацию NF-κB [32], возможно, что PSH благодаря супероксиддисмутазной и пероксидазной активности оказывает аналогичное действие. Интересно отметить, что введение PSH перед И-Р вызывает подавление экспрессии NF-κB и IL-18, но при этом способствует росту уровня IL-6 по сравнению с И-Р-группой. Известно, что IL-6 может оказывать не только провоспалительный эффект, но также может стимулировать регенеративные процессы в клетке [33].

Уровень экспрессии генов синтаз оксида азота (индуцибельной iNOS и эндотелиальной eNOS) при И-Р-поражении существенно увеличен: iNOS в 14 раз, а eNOS — в 22 раза, что приводит к адаптивному росту уровня NO в крови [34]. В ряде работ отмечена важная роль оксида азота (NO) в уменьшении сосудистого тромбообразования во время реперфузионного периода. Кроме того, NO препятствует миграции и слипанию моноцитов в сосудах, регулирует канальцево-клубочковую обратную связь в почках, что приводит к изменению соотношения тонуса приносящих и выносящих артериол клубочка, экскреции натрия и регуляции уровня ангиотензина, который является важным элементом в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе, посредством которого происхо-

дит регуляция сосудистого тонуса [35]. При предварительном введении рекомбинантного фермента PSH не наблюдается такого резкого роста iNOS и eNOS, хотя и отмечается их повышение относительно контрольной группы примерно в три раза. Снижение активации iNOS и eNOS может быть связано с подавлением активности NF-κB под действием PSH [36].

Исследование уровня экспрессии транскрипционного фактора AP-1 (регулирующего апоптоз клеток) в почечной ткани показало, что в группе с И-Р наблюдается увеличение уровня экспрессии более чем в семь раз. В тех же группах наряду с повышенным уровнем AP-1, наблюдается увеличение уровня эффекторной каспазы-3 (Casp-3) примерно в 3.5–4.0 раза. Это увеличение может быть связано с тем, что в почечной ткани наблюдается повышение гибели клеток по апоптотическому/некротическому пути. В группах с предварительным введением PSH уровень экспрессии AP-1 и Casp-3 увеличен примерно в 3.0–3.5 раза, что на 30–40% ниже, чем в группе с И-Р без предварительного PSH.

Для подтверждения того, что повышение уровня экспрессии каспазы-3, действительно, связано с ее индукцией в клетках почечной ткани и запуском апоптоза при И-Р поражении, был проведен иммуноблоттинг тканей почек спустя 24 ч после И-Р и предварительного введения PSH перед И-Р (рис. 4.)

Показано, что в группе с И-Р без предварительного введения PSH наблюдается повышенный уровень активации каспазы-3 (примерно в 2.5–3.0 раза по сравнению с интактной группой). Эти результаты указывают на увеличение апоптотической гибели клеток в почечной ткани. Предварительное введение PSH перед И-Р подавляет активацию каспазы-3 в клетках ткани примерно на 30%, что приводит к снижению гибели клеток и сохранению структурной целостности почечной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что предварительное введение рекомбинантного химерного фермента антиоксиданта PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии способно уменьшить степень И-Р-поражения почки. Это приводит к снижению смертности животных и сохранению морфофизиологических параметров тканей почек. Нефропротекторный эффект PSH обусловлен наличием пероксидазной и супероксиддисмутазной активностей, которые позволяют химерному ферменту антиоксиданту нейтрализовать окислительный стресс, развивающийся при И-Р-поражении. Кроме того, терапевтический эффект может быть обусловлен участием PSH в сигнально-регуляторных путях клетки [15,

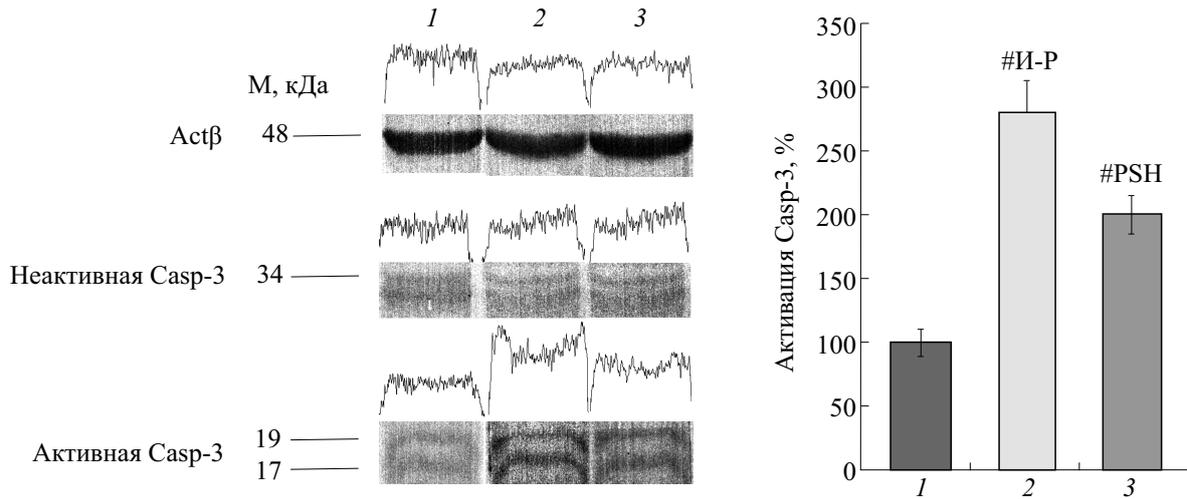


Рис. 4. Иммуноблоттинг почечной ткани для Actβ и Casp-3 после тридцатиминутной ишемии и предварительного введения фермента PSH за 15 мин перед тридцатиминутной ишемией с последующей 24-часовой реперфузией: 1 – интактные мыши; 2 – ишемия – 30 мин, реперфузия – 24 ч, без лечения; 3 – внутривенное введение PSH. Данные нормализованы по Actβ. Уровень активации Casp-3 определялся отношением pro-Casp-3 (35 кДа) к расщепленной Casp-3 (17–19 кДа). $n = 5$ для каждой из групп, # – $p < 0.05$.

37]. Полученные данные коррелируют с данными о протекторной роли PSH в условиях окислительного стресса на моделях ретроградной перфузии изолированного сердца [38].

Применение химерных антиоксидантных ферментов, в частности PSH, может быть перспективным подходом в предупреждении и лечении ишемически-реперфузионных поражений [39]. Известно, что длительное применение белковых препаратов может привести к иммунологическим реакциям, поэтому на практике наиболее вероятно кратковременное применение рекомбинантного фермента PSH при острой фазе И-Р-поражений. Мы предполагаем, что наиболее перспективным подходом может быть использование PSH в составе перфузионных сред для сохранения изолированной почки при трансплантации, что требует проведения дополнительных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 17-04-00356-а, 19-04-00080-а) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с международно-правовыми нормами, указанными в Европейской конвенции ETS №123 «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [40], и «Руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Cadenas, *Free Radic. Biol. Med.* **117** (11), 76 (2017).
2. S. Uchino, J. A. Kellum, R. Bellomo, et al., *JAMA* **294** (7), 813 (2005).
3. D. N. Granger and P. R. Kvietys, *Redox Biol.* **6**, 524 (2015).
4. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., *Kidney Int.* **72** (12), 1493 (2007).
5. Y. E. Yoon, K. S. Lee, K. H. Choo, et al, *PLoS One* **10** (4), 1 (2015).
6. И. В. Зарубина, А. В. Горяинов и П. Д. Шабанов, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии* **8** (2), 3 (2010).
7. M. Scortegagna, K. Ding, Y. Oktay, et al., *Nature Genetics* **35** (4), 331 (2003).
8. P. P. Kapitsinou and V. H. Haase, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **309** (10), 821 (2015).
9. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др, *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты* (Слово, М., 2006).
10. В. И. Новоселов, В. К. Равин, М. Г. Шарапов и др, *Биофизика* **56** (5), 873 (2011).
11. A. G. Volkova, M. G. Sharapov, V. K. Ravin, et al, *Russian Pulmonology* **6** (2), 84 (2017).

12. A. E. Gordeeva, A. A. Temnov, A. A. Charnagalov, et al., *Digestive Dis. Sci.* **60** (12), 3610 (2015).
13. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.* **378** (2), 319 (2019).
14. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, et al., *Free Radic. Res.* **51** (2), 148 (2017).
15. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and S. V. Gudkov, *Antioxidants* **8** (1), 15 (2019).
16. Y. Manevich, T. Shuvaeva, C. Dodia, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **485** (2), 139 (2009).
17. I. V. Peshenko and H. Shichi, *Free Radic. Biol. Med.* **31** (3), 292 (2001).
18. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and V. K. Ravin, *Biochemistry* **81**, 420 (2016).
19. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and V. K. Ravin, *Mol. Biol. (Moscow)* **43** (3), 465 (2009).
20. Q. Wei and Z. Dong, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303** (11), 1487 (2012).
21. S. Kuure, *Kidney Development* **886**, 147 (2012).
22. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, N. V. Penkov, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **134**, 76 (2019).
23. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, *Nature Protocols* **3** (6), 1101 (2008).
24. P. Williams, H. Lopez, D. Britt, et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **37** (1), 1 (1997).
25. S. Gowda, P. B. Desai, S. S. Kullkarni, et al., *North Am. J. Med. Sci.* **2** (4), 170 (210).
26. E. E. Hesketh, A. Czopek, and M. Clay, *Visual. Exp. J.*, **15** (88), 1 (2014).
27. T. M. Yu, K. Palanisamy, K. T. Sun, et al., *Sci. Rep.* **6** (7), 1 (2015).
28. J. V. Bonventre, *Trans. Am. Clin. Climatol. Ass.* **125**, 293 (2014).
29. Е. Б. Меньшикова, В. О. Ткачѳв и Н. К. Зенков, *Молекуляр. биология* **44** (3), 389 (2010).
30. M. A. Aminzadeh, S. B. Nicholas, and K. C. Norris, *Nephrol. Dialysis Transpl.* **28** (8), 2038 (2013).
31. B. Pires, R. Silva, G. Ferreira, et al., *Genes* **9** (1), 24 (2018).
32. Y. Yamamoto, M. J. Yin, and R. B. Gaynor, *J. Biol. Chem.* **274** (38), 27307 (1999).
33. J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (5), 878 (2011).
34. E. G. Shesely, N. Maeda, H. S. Kim, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (97), 13176 (1996).
35. T. Ishimura, F. Fujisawa, S. Isotani, et al., *Transplant. Int.* **15**, 635 (2002).
36. T. Wang, X. Zhang, and J. J. Li, *Immunopharmacol. Int.* **2** (11), 1509 (2002).
37. M. G. Sharapov, V. K. Ravin, and V. I. Novoselov, *Mol. Biol. (Moscow)* **48** (4), 600 (2014).
38. Е. В. Карадулева, Э. К. Мубаракшина, М. Г. Шар-пов и др., *Бюл. эксп. биол. мед.* **160** (11), 584 (2015).
39. A. V. Maksimenko and A. V. Vavaev, *Heart Int.* **7** (3), 14 (2012).
40. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, *Cets* **170**, 123 (1986).

Protective Effect of Chimeric PSH Antioxidant Enzyme in Renal Ischemia-Reperfusion Injury

R.G. Goncharov* **, G.I. Filkov, A.V. Trofimenko**, V.V. Boyarintsev**,
V.I. Novoselov* **, and M.G. Sharapov* **,**

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

The most dangerous stage of ischemia-reperfusion injury is a rapid increase in the concentration of free radicals and reactive oxygen species at the reperfusion stage. An avalanche-like increase in the level of reactive oxygen species and secondary products of free radical oxidation of biological macromolecules leads to the development of oxidative stress. The use of exogenous antioxidants can reduce the concentration of reactive oxygen species in the affected tissues, suppress or correct the course of oxidative stress, thereby significantly reducing the severity of ischemia-reperfusion injury. A comprehensive list of pathologies associated with ischemia-reperfusion includes ischemic acute renal failure which is one of the most important social problems. An animal model of bilateral ischemia-reperfusion renal injury was used to show the nephroprotective effect of the chimeric antioxidant enzyme PSH which included human peroxiredoxin 6 and the *Escherichia coli* Mn-containing superoxide dismutase. Because of the presence of superoxide dismutase and peroxidase activities, the recombinant chimeric protein PSH is able to neutralize as wide a range of reactive oxygen species as possible. Using histological, biochemical, and molecular biological methods, it has been shown that the preliminary administration of the PSH chimeric protein before ischemia-reperfusion significantly reduces the degree of renal tissue injury leading to a quick normalization of their structural and functional state. In addition, the introduction of the PSH enzyme increases the survival of experimental animals by a factor of more than 1.5. The use of the recombinant chimeric PSH enzyme can be an effective approach in the prevention and treatment of renal ischemia-reperfusion injury, as well as for maintaining an isolated kidney during transplantation.

Keywords: peroxiredoxin, superoxide dismutase, chimeric enzymes, oxidative stress, ischemia-reperfusion, kidney

УДК 577.3

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ АУРУМАКРИЛА И ЦИТОСТАТИКОВ РАЗЛИЧНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

© 2020 г. Л.А. Островская*, Д.Б. Корман*, Н.В. Блюхтерова*, М.М. Фомина*, В.А. Рыкова*, К.А. Абзаева**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН, 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1

E-mail: larros@list.ru

Поступила в редакцию 09.01.2020 г.

После доработки 09.01.2020 г.

Принята к публикации 21.01.2020 г.

Проведено сравнительное экспериментальное изучение противоопухолевой активности нового для онкологии препарата аурумакрила и ряда известных цитостатиков различного механизма действия – цисплатина, циклофосфана, 5-фторурацила и доксорубицина – на моделях солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис и аденокарцинома Акатол). Установлена преимущественная по сравнению с другими цитостатиками (за исключением циклофосфана) активность аурумакрила, ингибирующего развитие карциномы легких Льюис и опухоли Акатол на 70–74% по сравнению с контролем соответственно.

Ключевые слова: экспериментальная противоопухолевая химиотерапия, солидные опухоли мышей, полиакрилат золота (аурумакрил), цисплатин, циклофосфан, 5-фторурацил, доксорубицин.

DOI: 10.31857/S0006302920020192

Одним из весьма перспективных направлений исследований в области биомедицинской химии, экспериментальной и клинической онкологии признано изучение металлоорганических соединений в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов. Интерес к металлоорганическим соединениям, особенно к структурам, содержащим благородные металлы, в значительной мере обусловлен открытием высокой противоопухолевой активности в ряду комплексных соединений платины, широко применяющихся в современной химиотерапии опухолей [1, 2].

Исследования последних лет выявили значительную противоопухолевую активность металлоорганических соединений, содержащих другой металл платиновой группы – золото. Показано, что золотосодержащие соединения обладают высокой цитотоксической активностью в отношении ряда стабильных клеточных линий опухолей человека *in vitro*, а также значимой противоопухолевой активностью в отношении опухолей животных *in vivo* [3–5]. Особый интерес золотосодержащие вещества вызывают в связи с тем, что мишени, на которые направлено их действие и

механизмы его реализации, отличают эти соединения от известных, клинически апробированных лекарственных средств. Характерные химические свойства этих соединений, обусловленные наличием иона золота, определяют их особый фармакологический профиль и механизм действия [6, 7].

Среди значительного многообразия изученных в последние годы металлоценов определенный интерес представляют металлопроизводные полиакриловой кислоты, относящиеся к новой для онкологии группе соединений, ранее в этом направлении не изучавшихся.

Наиболее эффективным среди препаратов этого ряда оказался полиакрилат золота (аурумакрил), проявивший значительную противоопухолевую активность в отношении перевиваемых опухолей животных *in vivo* и стабильных клеточных линий опухолей человека *in vitro* [8–11].

Как известно, одним из необходимых этапов исследования нового соединения является сравнительное изучение противоопухолевой эффективности этого препарата и цитостатиков иного механизма действия.

В данной статье обобщены результаты сравнительного экспериментального исследования ау-

румакрила и широко применяемых в клинической онкологии конвенциональных препаратов — цисплатина, циклофосфана, 5-фторурацила и доксорубина — на моделях солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис и аденокарцинома Акатол).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты. Исследуемый препарат — полиакрилат золота, имеющий условное название аурумакрил, представляет собой неполную металлическую соль полиакриловой кислоты, содержащую ионы трехвалентного золота (массовая доля металла 8.03 масс. %). Общая формула аурумакрила $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOO}(\text{AuCl}_3\text{H})-)_m$, где $n = 1263$; $m = 124$; молекулярная масса — 100–300 кДа. Инфракрасные спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной и карбоксилатной групп при 1720 и 1570 см^{-1} соответственно. Субстанция аурумакрила — стекловидные пластинки желтого цвета, хорошо растворимые в воде. Препарат вводили животным пятикратно на первые-пятые сутки после перевивки опухоли в суточной дозе 10 мг/кг внутривентриально в виде водного раствора, приготовленного на апиrogenной дистиллированной воде для инъекций, в объеме 0.2 мл.

Препаратами сравнения служили широко применяемые в клинической онкологии конвенциональные цитостатики — цисплатин (Тева, Израиль), циклофосфан (Baxter, Германия), 5-фторурацил (Тева, Израиль), доксорубин (Pfizer, США), которые вводили внутривентриально в оптимальных терапевтических дозовых режимах, указанных при описании полученных результатов.

Лабораторные животные. Эксперименты проведены на 300 инбредных мышах, самцах: BDF_1 — гибридах первого поколения $f_1(\text{C}_{57}\text{Bl}/6 \times \text{DBA}_2)$ и мышах линии Balb/c, массой 18–20 г, разведения питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦ-БМТ ФМБА России». Каждая группа животных, получавших препарат, состояла из шести мышей при восьми животных в контроле.

Модели опухолей животных. В качестве опухолевых тест-систем служили солидные опухоли — карцинома легких Льюис (мышы BDF_1), аденокарцинома Акатол (мышы Balb/c). Перевивку опухолей осуществляли в соответствии со стандартными методиками под кожу правого бока мышы измельченными фрагментами опухолевой ткани, содержащимися в физиологическом растворе хлористого натрия. Размер инокулама составлял 0.3 мл [12].

Оценка противоопухолевого эффекта. Ростингибирующий эффект препаратов оценивался на основе изучения кинетики роста опухолей у лече-

ных и контрольных животных. Для изучения кинетики роста опухолей проводили измерение двух взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла на протяжении всего периода развития опухолей. Объем опухоли вычисляли в соответствии с формулой для эллипсоида как $V = ab^2/2$, где a — длина, b — ширина и высота опухолевого узла. Масса опухоли соответствует ее объему, поскольку плотность опухолевой ткани принято считать равной 1 $\text{г}/\text{см}^3$. Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО%) определяли из соотношения $\text{ТРО} = (P_C - P_T)/P_C$, где P_C и P_T — средняя масса опухоли мышы в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных соответственно [12, 13].

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из трех независимых экспериментов. Различия считали достоверными при $p < 0.05$ [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение противоопухолевой активности аурумакрила в сравнении с эффектом цитостатиков различного механизма действия — алкилирующими агентами (цисплатином, циклофосфаном), антиметаболитом (5-фторурацилом), противоопухолевым антибиотиком (доксорубицином) — проведено на моделях солидных опухолей мышы.

Результаты исследования влияния препаратов на развитие карциномы легких Льюис и аденокарциномы Акатол представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

Сравнительная оценка противоопухолевого эффекта препаратов различных классов на модели карциномы Льюис свидетельствует о преимущественной активности аурумакрила по сравнению с большинством изученных цитостатиков за исключением циклофосфана. Так, аурумакрил ингибирует развитие опухоли на 70% по сравнению с контролем, в то время как эффективность цисплатина составляет около 30%, а 5-фторурацила и доксорубина — 55 и 47% соответственно. Однако аурумакрил уступает в эффективности циклофосфану, вызывающему торможение развития карциномы Льюис на 94% по сравнению с контролем при двукратном введении по 100 мг/кг в сутки (рис. 1, табл. 1).

На модели аденокарциномы Акатол аурумакрил также несколько уступает в активности циклофосфану, превосходя эффект остальных изученных цитостатиков. Циклофосфан, будучи наиболее эффективным препаратом, ингибирует

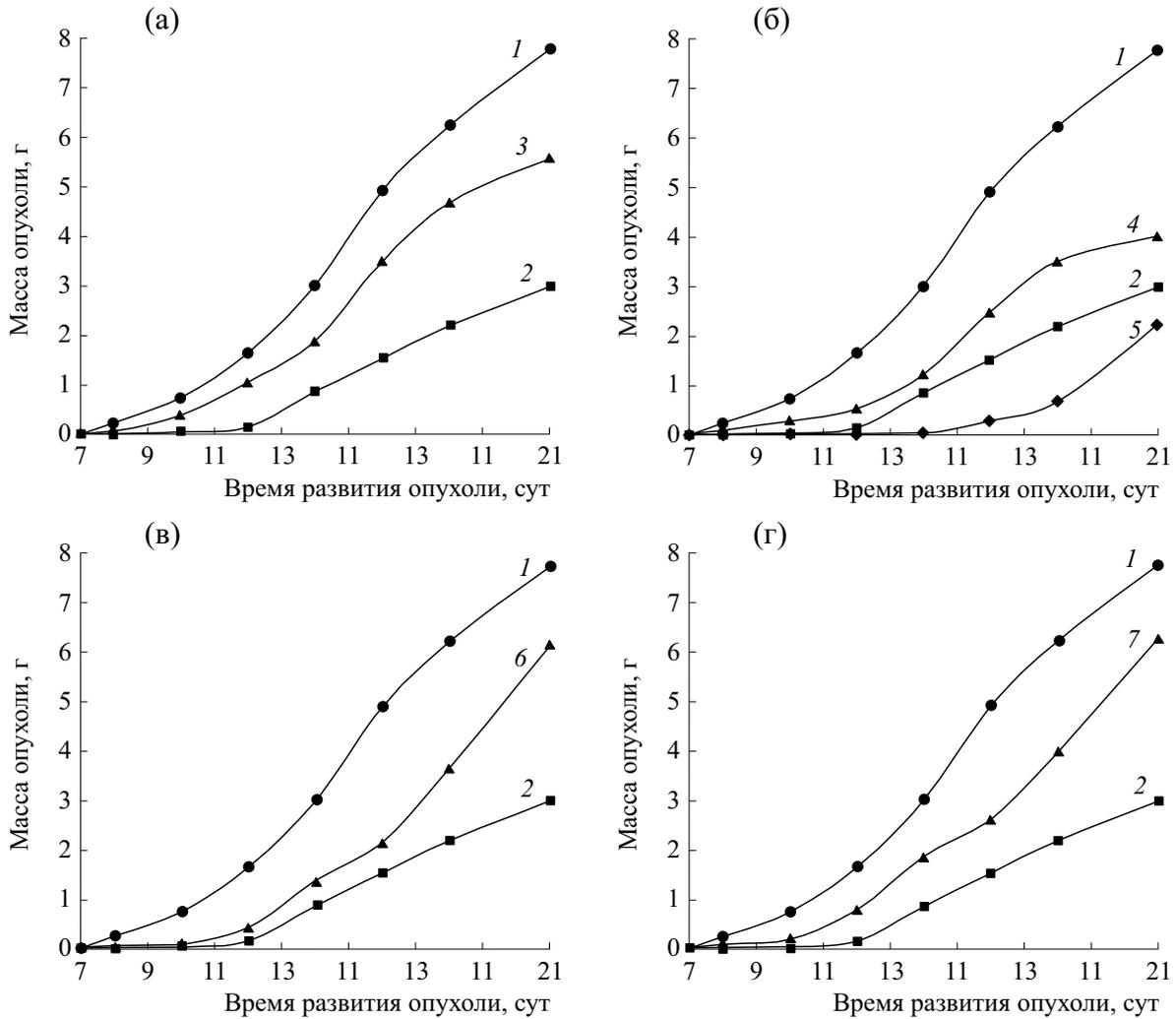


Рис. 1. Противоопухолевая активность аурумакирила и цитостатиков других групп на модели карциномы легких Льюис. Панель (а): 1 – контроль; 2 – аурумакирил, 10 мг/кг, пятикратно; 3 – цисплатин, 1 мг/кг, пятикратно; панель (б): 1 – контроль; 2 – аурумакирил, 10 мг/кг, пятикратно; 4 – циклофосфан, 25 мг/кг, пятикратно; 5 – циклофосфан, 100 мг/кг, двукратно; панель (в): 1 – контроль; 2 – аурумакирил, 10 мг/кг, пятикратно; 6 – 5-фторурацил, 25 мг/кг, пятикратно; панель (г): 1 – контроль; 2 – аурумакирил, 10 мг/кг, пятикратно; 7 – доксорубицин, 2 мг/кг, пятикратно.

развитие данной опухоли на 90%, аурумакирил – на 74%, а цисплатин, 5-фторурацил и доксорубицин – на 57, 50 и 56% по сравнению с контролем соответственно (рис. 2, табл. 2).

Следует отметить, что регистрируемые эффекты сохраняются на протяжении достаточно длительного времени и наблюдаются спустя 11–16 суток после окончания введения препаратов (табл. 3).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о несомненной противоопухолевой активности аурумакирила, представляющего собой новое для онкологии вещество, вызывающее торможение роста карциномы легких Льюис и аденокарциномы Акатол на 70–74% на протяжении 11-ти и 16-ти суток после окончания применения соответственно. Показано, что аурумакирил

превосходит по эффективности такие известные широко применяющиеся цитостатики различного механизма действия, как цисплатин, 5-фторурацил и доксорубицин, несколько уступая в активности только циклофосфану.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования дополняют полученные нами ранее данные о значительной эффективности аурумакирила на моделях солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Са-755 и аденокарцинома Акатол) *in vivo*, а также в отношении ряда стабильных клеточных линий опухолей человека различного генеза (меланома Mel Mo, рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549) *in vitro* [14, 15].

Таблица 1. Противоопухолевая активность аурумакрила и цитостатиков других групп на модели карциномы легких Льюис

Препарат	Разовая доза (мг/кг), режим введения	Время оценки эффекта (сутки после перевивки)	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО%)
			леченые животные	контрольные животные	
Аурумакрил	10; 1–5 сут	16	1.5 ± 0.1	4.9 ± 0.3	70
		21	3.0 ± 0.1	7.8 ± 0.5	62*
Цисплатин	1; 1–5 сут	16	3.5 ± 0.1	4.9 ± 0.3	29
		21	5.6 ± 0.3	7.8 ± 0.5	28
Циклофосфан	25; 1–5 сут	16	2.5 ± 0.2	4.9 ± 0.3	49
		21	0.3 ± 0.1	4.9 ± 0.3	94
	100; 1 и 5 сут	16	4.0 ± 0.3	7.8 ± 0.5	38
		21	2.2 ± 0.2	7.8 ± 0.5	72*
5-Фторурацил	25; 1–5 сут	16	2.2 ± 0.2	4.9 ± 0.3	55
		21	6.2 ± 0.6	7.8 ± 0.5	21
Доксорубин	2; 1–5 сут	16	2.6 ± 0.2	4.9 ± 0.3	47
		21	6.3 ± 0.5	7.8 ± 0.5	19

Примечание. * – Различия между указанными группами отсутствуют. Во всех остальных группах различия в показателях средней массы опухолей у мышей, получавших аурумакрил и препараты сравнения, достоверны ($p < 0,05$).

Показано, что аурумакрил обладает активностью, сопоставимой с эффективностью ряда широко применяющихся цитостатиков различного механизма действия, таких как цисплатин, циклофосфан, 5-фторурацил и доксорубин.

Для позиционирования потенциального лекарственного средства в современной противоопухолевой химиотерапии необходимым требованием является наличие представлений о возможных молекулярных мишенях и механизмах противоопухолевого действия препарата, которые для аурумакрила остаются пока невыясненными.

Согласно существующим представлениям, биомишенями для золотосодержащих препаратов могут служить белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации опухолевых клеток, в развитии процессов апоптоза и ангиогенеза [5, 7].

Показано, в частности, на ряде моделей стабильных клеточных линий опухолей человека высокоспецифичное ингибирование под влиянием препаратов золота такого фермента семейства пиридиннуклеотидоксиредуктаз, как митохондриальная тиоредоксинредуктаза, имеющая в своем активном центре селен, который высокочувствителен к действию тяжелых металлов. Результатом такого взаимодействия является повреждение митохондриальной мембраны, выход в цитозоль цитохрома *c* и индукция апоптоза [16, 17].

Обнаружено также модулирование препаратами золота активности протесом и уменьшение содержания антиапоптотических белков, что приводит к стимуляции процессов апоптоза клеток. Высока вероятность влияния золота на белки, входящие в сигнальный каскад трансдукции митогенных сигналов, что может вести к подавлению клеточной пролиферации и гибели клеток [6, 7, 18].

Необходимо отметить, что аурумакрил является первым и пока единственным полимерным соединением среди изученных золотосодержащих веществ, очевидно способным в определенных условиях формировать наноразмерные частицы золота в полимерной матрице, что, возможно, вносит свой вклад в особенности метаболизма этого препарата в физиологических условиях [19].

Наряду с этим, исходя из известных представлений о некоторой преимущественной предрасположенности опухолевых клеток к взаимодействию с полианионами, можно рассчитывать на возможность избирательного взаимодействия полиакрилата золота, как выраженного полианиона, с клетками опухоли [20].

Можно также предположить, что, взаимодействуя в качестве полианиона с положительно заряженными белками, в частности с гистонами, аурумакрил способен вызывать повреждение хроматина с последующим нарушением функций ДНК [18].

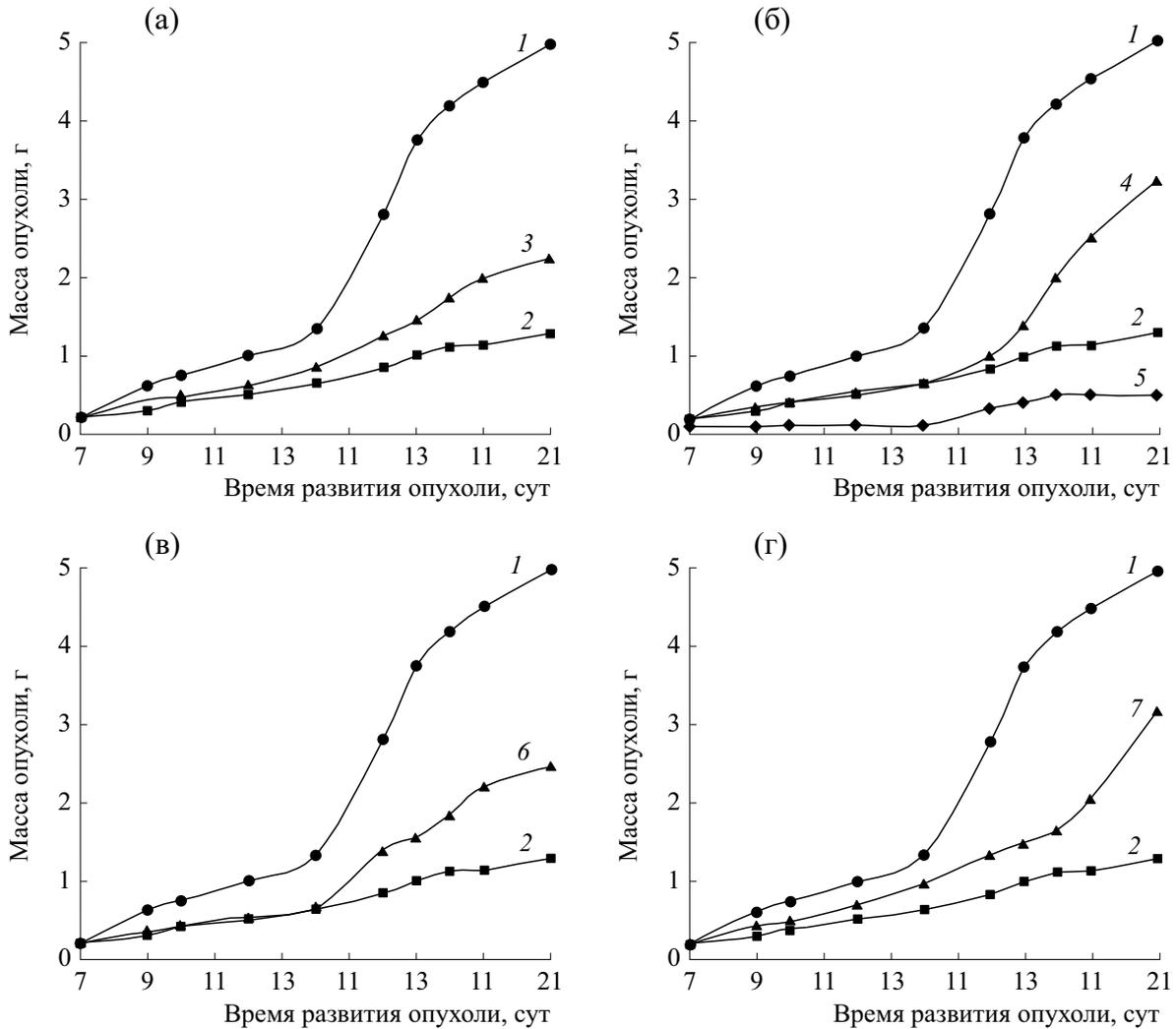


Рис. 2. Противоопухолевая активность аурумакрила и цитостатиков других групп на модели аденокарциномы Акатол. Панель (а): 1 – контроль; 2 – аурумакрил, 10 мг/кг, пятикратно; 3 – цисплатин, 1 мг/кг, пятикратно; панель (б): 1 – контроль; 2 – аурумакрил, 10 мг/кг, пятикратно; 4 – циклофосфан, 25 мг/кг, пятикратно; 5 – циклофосфан, 100 мг/кг, двукратно; панель (в): 1 – контроль; 2 – аурумакрил, 10 мг/кг, пятикратно; 6 – 5-фторурацил, 25 мг/кг, пятикратно; панель (г): 1 – контроль; 2 – аурумакрил, 10 мг/кг, пятикратно; 7 – доксорубицин, 2 мг/кг, пятикратно.

Вышеизложенные соображения позволяют отнести золотосодержащие соединения к потенциальным противоопухолевым агентам с мультитаргетным механизмом действия, подлежащим специальному целенаправленному исследованию.

Изучение детального механизма и мишеней противоопухолевого действия аурумакрила является одной из основных задач дальнейших исследований этого перспективного препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено сравнительное экспериментальное изучение противоопухолевой активности нового для онкологии препарата аурумакрил и ряда из-

вестных цитостатиков различного механизма действия – цисплатина, циклофосфана, 5-фторурацила и доксорубицина – на моделях солидных опухолей мышей.

Показано, что аурумакрил, представляющий собой новое для онкологии вещество, вызывает торможение роста карциномы легких Льюис и аденокарциномы Акатол на 70–74% на протяжении 11-ти и 16-ти суток после окончания применения соответственно.

Установлено, что аурумакрил превосходит по эффективности такие известные широко применяющиеся цитостатики различного механизма действия, как цисплатин, 5-фторурацил и доксорубицин, несколько уступая в активности лишь циклофосфану.

Таблица 2. Противоопухолевая активность аурумакрила и цитостатиков других групп на модели аденокарциномы Акатолс

Препарат	Разовая доза (мг/кг), режим введения	Время оценки эффекта (сутки после перевивки)	Средняя масса опухоли, г		Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО%)
			леченые животные	контрольные животные	
Аурумакрил	10; 1–5 сут	16	0.8 ± 0.1	2.8 ± 0.5	71*
		21	1.3 ± 0.1	5.0 ± 0.6	74
Цисплатин	1; 1–5 сут	16	1.2 ± 0.1	2.8 ± 0.5	57*
		21	2.2 ± 0.2	5.0 ± 0.6	56
Циклофосфан	25; 1–5 сут	16	1.0 ± 0.3	2.8 ± 0.5	64*
	100; 1 и 5 сут		0.3 ± 0.1	2.8 ± 0.5	89
	25; 1–5 сут	21	3.2 ± 0.3	5.0 ± 0.6	36
	100; 1 и 5 сут		0.5 ± 0.1	5.0 ± 0.6	90
5-Фторурацил	25; 1–5 сут	16	1.4	2.8 ± 0.5	50
		21	2.5	5.0 ± 0.6	50
Доксорубицин	2; 1–5 сут	16	1.3	2.8 ± 0.5	53
		21	3.2	5.0 ± 0.6	36

Примечание. * – Различия между указанными группами отсутствуют. Во всех остальных группах различия в показателях средней массы опухолей у мышей, получавших аурумакрил и препараты сравнения, достоверны ($p < 0.05$).

Таблица 3. Сравнительная оценка противоопухолевой эффективности аурумакрила и препаратов различных классов на моделях солидных опухолей мышей

Препарат	Разовая доза, мг/кг/сутки	Карцинома легких Льюис		Аденокарцинома Акатол	
		ТРО% 11-е сутки*	ТРО% 16-е сутки*	ТРО% 11-е сутки*	ТРО% 16-е сутки*
Аурумакрил 1–5 сут	10	70	62	71	74
Цисплатин 1–5 сут	1	29	28	57	56
Циклофосфан 1–5 сут	100	94	72	89	90
5-Фторурацил 1–5 сут	25	55	21	50	50
Доксорубицин 1–5 сут	2	47	19	53	36

Примечание. * – Время после окончания введения препарата.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Д. Б. Корман, *Основы противоопухолевой химиотерапии* (Практическая медицина, М., 2006).
2. A. Markowska, B. Kospzak, K. Jaszczynska-Nowinka, et al., *Comtemp. Oncol. (Pozn.)*. **19**, 271 (2015).
3. M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, et al., *Curr. Pharm. Des.* **16**, 1813 (2010).
4. C. Nardon and D. Fregona, *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 360 (2016).
5. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, et al., *Med. Res. Rev.* **30**, 580 (2010).
6. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Вопр. онкологии* **64** (6), 697 (2018).
7. Д. Б. Корман, Л. А. Островская и В. А. Кузьмин, *Биофизика* **64** (3), 552 (2019).
8. L. A. Ostrovskaya, M. G. Voronkov, D. B. Korman, et al., *J. Cancer Ther.* **1** (2), 59 (2010).
9. L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, and N. V. Bluhterova, *Biointerface Res. Appl. Chem.* **4** (4), 816 (2014).
10. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман и др., *Биофизика* **59** (4), 785 (2014).
11. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 12, 2333 (2017).
12. Е. М. Трещалина, О. С. Жукова, Г. К. Герасимова и др., в сб. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, под ред. А. Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012), ч. 1, сс. 642–657.
13. Л. А. Островская, С. Д. Варфоломеев, М. Г. Воронков и др., *Изв. РАН. Сер. хим.*, № 5, 1211 (2014).
14. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова и др., *Хим. физика* **38** (12), 64 (2019).
15. Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Л. А. Островская и др., *Биофизика* **64** (6), 1138 (2019).
16. D. Saggiaro, M. P. Rigobello, L. Paloschi, et al., *Chem. Biol.* **14**, 128 (2007).
17. L. Ronconi, D. Aldinucci, Q. P. Don, and D. Fregona, *Anticancer Agents Med. Chem.* **10**, 283 (2010).
18. A. Casini, L. Messori, *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2647 (2011).
19. Б. И. Западинский, А. В. Котова, И. А. Матвеева и др., *Хим. физика* **29** (10), 87 (2010).
20. Н. А. Платэ и А. Е. Васильев, *Физиологически активные полимеры* («Химия», М., 1986).

Comparative Experimental Study of Antitumor Activity between Aurumacryl and Cytostatics with Different Mechanisms of Action

L.A. Ostrovskaya*, D.B. Korman*, N.V. Bluhterova*, M.M. Fomina*,
V.A. Rikova*, and K.A. Abzaeva**

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

**Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
ul. Favorskogo 1, Irkutsk, 664033 Russia

The aim of our research was to compare the antitumor activity of aurumacryl, a new cancer drug, and a range of well-known cytostatics with different mechanisms of action such as cisplatin, cyclophosphan, 5-fluorouracil and doxorubicin on experimental murine solid tumor models (Lewis lung carcinoma and Acatol adenocarcinoma). The obtained results showed that the activity of aurumacryl was higher than that of the studied cytostatics (except for cyclophosphan). The tumor growth inhibitory effect of aurumacryl against Lewis lung carcinoma and Acatol adenocarcinoma was equal to 70% and 74%, respectively, as compared to control.

Keywords: experimental antitumor chemotherapy, murine solid tumors, aurum polyacrylate (aurumacryl), cisplatin, cyclophosphan, 5-fluorouracil, doxorubicin

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ В УСЛОВИЯХ ОЗОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2020 г. Т.Г. Щербатюк*, **, Е.С. Жукова (Плеханова)*, Ю.В. Никитина*, А.Б. Гапеев***

*Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

**Пушкинский государственный естественно-научный институт Минобрнауки России,
142290, Московская область, Пушкино Московской области, проспект Науки, 3

***Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: ozone_stg@mail.ru

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 20.01.2020 г.

С использованием модели карциномы почки РА исследовано озono-фотодинамическое воздействие на скорость опухолевого роста и окислительную модификацию белков в тканях крыс. Показано, что разработанный экспериментально-терапевтический метод, основанный на совместном парентеральном введении озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л внутривентрально и 0.3% раствора фотосенсибилизатора «Фотосенс» интратуморально с локальным действием света с длиной волны 660 ± 10 нм в течение 10 мин, снижает интенсивность опухолевого роста. На фоне комбинированного применения озонированного физиологического раствора и фотодинамической терапии наблюдается нормализация про-/антиоксидантного баланса в организме экспериментальных животных.

Ключевые слова: фотодинамическое воздействие, озонированный физиологический раствор, окислительный стресс, окислительная модификация белков, экспериментальная карцинома почки, аутобредные крысы.

DOI: 10.31857/S0006302920020209

Фотодинамическое воздействие, генерирующее активные формы кислорода при облучении фотосенсибилизатора светом, используется в онкологической практике в основе фотодинамической терапии (ФДТ), которая рассматривается как многообещающий подход при лечении поверхностно расположенных злокачественных новообразований, множественных опухолей, первичных и метастатических поражений у инкурабельных больных, у пациентов с тяжелыми сопутствующими патологиями [1]. Однако несмотря на целый ряд преимуществ ФДТ, таких как малая инвазивность, высокая избирательность поражения новообразования, низкая темновая токсичность вводимых фотосенсибилизаторов, отсутствие риска тяжелых местных и си-

стемных поражений, возможность проведения ранней диагностики и органосохраняющей терапии, одновременное совмещение диагностики и терапии [1], противоопухолевая эффективность фотодинамического воздействия во многом зависит от кровоснабжения и степени оксигенации опухоли [2]. Одним из подходов, способствующих увеличению насыщенности кислородом крови и тканей, является озонотерапия [3].

Ранее мы показали, что применение озонированного физиологического раствора (ОФР) в комплексе с ионизирующим излучением селективно управляет тканевой радиочувствительностью, повышает терапевтический интервал между опухолевой и нормальной тканью. Вызванная озонотерапией искусственная оксигенация, преодолевающая радиорезистентность гипоксических клеток лимфосаркомы Плисса, позволила снизить дозу гамма-облучения и, следовательно, уменьшить нагрузку на здоровые ткани организма [4]. Синергизм озono- и химиотерапии был проде-

Сокращения: ФДТ – фотодинамическая терапия, ОФР – озонированный физиологический раствор, ОМБ – окислительная модификация белков, ДНФГ – динитрофенилгидразоны, ТБК – тиобарбитуровая кислота, ОИП – ориентировочно-исследовательское поведение.

монстрирован нами на моделях крысиных опухолевых штаммов – гепатоме-27 и гепатоме Зайделя. Нами было показано, что совместное применение ОФР и 5-фторурацила крысам с перевитой гепатомой-27 и гепатомой Зайделя тормозит рост опухоли на 54 и 66% и увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных на 62 и 86% соответственно [5]. Применение такой комбинированной терапевтической схемы приводит к коррекции про-/антиоксидантного баланса в организме опухоленосителей, снижает уровень окислительной модификации белков (ОМБ), повышает общую антиоксидантную активность и активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и каталазы) в крови животных в условиях роста гепатомы-27 и гепатомы Зайделя. Комбинированное введение ОФР и доксорубина в дозах 0.6 и 1.2 мг/кг внутривенно крысам с гепатомой Зайделя общим курсом семь суток тормозило рост опухоли на 54 и 56% соответственно, а также снижало общую свободнорадикальную активность, интенсивность перекисного окисления липидов, активность супероксиддисмутазы и каталазы [6].

Принимая во внимание, что озонотерапия может уменьшить опухолевую гипоксию, привести к менее агрессивному поведению опухоли и представляется действенным адъювантом во время проведения ФДТ, мы выполнили серию экспериментов по разработке способа повышения противоопухолевой эффективности ФДТ.

Цель исследования состояла в оценке противоопухолевой эффективности комбинированного применения фотодинамического воздействия и озонированного физиологического раствора с контролем влияния этого воздействия на ОМБ тканей организма лабораторных животных-опухоленосителей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В исследованиях были использованы 2.5-месячные аутбредные крысы-самцы SD (Sprague Dawley) массой 250 ± 25 г, приобретенные в НПП «Питомник лабораторных животных» (Пушино Московской обл.). Эксперименты проводили на базе кафедры биологии Приволжского исследовательского медицинского университета (ПИМУ, Нижний Новгород) в весенне-летний период. Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественным освещением, получали полнорационный комбикорм («Лабораторкорм», Москва) и без ограничений питьевую водопроводную воду. До ввода в эксперимент крысы ($n = 105$) были протестированы в тесте «Открытое поле» [7] в ранее предложенной модификации [8] для выявления девиантного поведения и отбраковывания особей. Определяли горизонтальную и вертикальную двигательную ак-

тивность, ориентировочно-исследовательскую активность, эмоциональность и уровень тревожности.

Эксперименты по исследованию комбинированного действия ОФР и ФДТ были выполнены на 32-х крысах. В качестве модели неоплазии была взята быстрорастущая опухоль – карцинома почки (штамм РА, РОНЦ им. Блохина РАМН, Москва). Инкубационный период опухоли не превышает семи-десяти суток, развитие опухоли полностью завершается к 26-м суткам от момента перевивки. Опухоль для инокуляции брали на 14-е сутки развития. Инокулюм РА вводили крысам подкожно в область левого бедра.

В эксперимент брали особей с исходным объемом подкожно перевитой опухоли от 0.5 до 4.2 см³. На девятые сутки после трансплантации животные были равномерно распределены в зависимости от объемов опухоли и их ориентировочно-исследовательской активности по группам: 1) животные-опухоленосители без воздействия «РА» ($n = 6$); 2) животные-опухоленосители, которым проводили инъекции озонированного физиологического раствора «ОФР» ($n = 6$); 3) животные-опухоленосители, которым проводили процедуры «ФДТ» ($n = 6$); 4) животные-опухоленосители, которым проводили комбинированную терапию «ФДТ + ОФР» ($n = 5$). Отдельную группу «Интактные» составили интактные крысы ($n = 9$), которые не подвергались никаким воздействиям.

Схема воздействия. Учитывая характер роста экспериментальной модели карциномы почки РА, была разработана следующая схема комбинированной терапии [9].

Для проведения ФДТ интратуморально вводили 0.3%-й раствор фотосенсибилизатора – гидроксид алюминия трисульфопталоцианин (ГНЦ «НИОПИК», Москва) в три точки опухоли из расчета 30% от объема опухоли. Затем через 10 ч после инъекций препарата на каждую точку в течение 10 мин воздействовали светодиодным лазером с длиной волны 660 ± 10 нм и интенсивностью излучения 100 мВт/см². В качестве источника света использовали аппарат физиотерапевтический светодиодный АФС (ООО «Полироник», Москва). Всего было проведено два сеанса ФДТ – на 15-е и 19-е сутки после перевивки.

Действие озона осуществляли введением ОФР в течение десяти суток (пять воздействий через сутки), начиная с десятых суток после перевивки опухолевого штамма. Внутривенно вводили по 0.5 мл ОФР с концентрацией озона в озонкислородной смеси 400 мкг/л. Инъекции ОФР животным осуществляли сразу после барботирования изотонического 0.9%-го раствора хлорида натрия озонкислородной смесью. Озонкис-

лородную смесь получали из медицинского сверхчистого кислорода на озонаторе «ТЕОЗОН» (РФЯЦ–ВНИИЭФ, Саров Нижегородской обл.) [10].

Методы оценки опухолевого роста. Противоопухолевый эффект проводимой терапии оценивали по коэффициенту абсолютного прироста опухоли (K), который рассчитывали на основе изменения объемов опухолевого узла по формуле (1):

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \quad (1)$$

где $V = \frac{\pi}{6} \cdot \left(\frac{d_1 + d_2}{2}\right)^3$ – объем опухолевого узла (см^3), V_0 – до воздействия, V_t – после воздействия на срок наблюдения t , d_1 и d_2 – два взаимно перпендикулярных поперечных сечения опухоли (в см). Значения $K \geq 0$ оценивали как продолженный рост неоплазии, $-1 \leq K < 0$ – как торможение роста, а $K = -1$ – как полную регрессию опухоли. Заключение о полной регрессии неоплазии делали на основании отсутствия видимого и пальпируемого очага [11].

Методы оценки параметров свободнорадикального окисления. На 20-е сутки после трансплантации опухоли животных выводили из эксперимента декапитацией под ингаляционным наркозом с последующим обескровливанием, затем проводили вскрытие с извлечением и фиксацией органов в жидком азоте [12]. Для биохимических исследований использовали плазму крови и гомогенаты тканей печени и селезенки. Гомогенизацию тканей осуществляли в жидком азоте методом растирания.

Для определения выраженности окислительного стресса, вызванного ростом опухоли и озono-фотодинамическим воздействием, оценивали показатели ОМБ как одного из ранних индикаторов повреждения ткани [13], перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы. Степень ОМБ анализировали по реакции карбонильных группировок с 2,4-динитрофенилгидразином: кетон-динитрофенилгидразонов (кетон-ДНФГ) и альдегид-динитрофенилгидразонов (альдегид-ДНФГ) при спонтанном и металл-индуцированном окислении [14]. Концентрацию карбонильных производных, образующихся в результате ОМБ, выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 мг белка или мл плазмы [15]. Детектировали ТБК-активные продукты (ТБК – тиобарбитуровая кислота) перекисного окисления липидов [14]. Интенсивность общей свободнорадикальной активности оценивали косвенно методом индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа хемилюминесценции [16]. Состояние антиоксидантной системы защиты оценивали по активности антиоксидан-

ных ферментов супероксиддисмутазы и каталазы в гомогенатах тканей. Об активности супероксиддисмутазы судили по реакции восстановления нитросинего тетразолия, каталазы – по изменению оптической плотности в области поглощения пероксида водорода [14]. Активность ферментов выражали в единицах активности на 1 г ткани.

Статистический анализ. Все эксперименты проведены по протоколу «слепого контроля», когда экспериментатор, проводивший измерения, не знал, какие воздействия были использованы. Все данные представлены в виде Me [25%; 75%], где Me – медиана регистрируемого параметра, а 25 и 75% – интерперцентильный размах. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и критерия множественного сравнения Стьюдента–Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных по тесту Колмогорова–Смирнова ($p < 0.016$). Для парного сравнения групп данных использовали U -критерий Манна–Уитни ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты по оценке опухолевого роста у крыс без воздействия и после проведенной терапии на 10-е и 20-е сутки после перевивки представлены в табл. 1. Случаев спонтанной регрессии трансплантированной карциномы почки РА у животных не было выявлено (табл. 1). После проведения фотодинамического воздействия полная регрессия карциномы наблюдалась в трех из шести случаев, а внутрибрюшные инъекции ОФР вызвали полную регрессию опухоли только в одном случае (табл. 1). При этом после ФДТ при продолженном росте карциномы в некоторых случаях наблюдалась интенсификация роста опухоли по сравнению с контролем, о чем можно судить по более высоким показателям коэффициента прироста опухоли (табл. 2).

Анализ индивидуальных физиологических особенностей крыс с интенсификацией роста опухоли после ФДТ показал, что они относятся к животным с исходно высоким уровнем ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) в тесте «Открытое поле» (табл. 3). Учитывая данные о связи поведения лабораторных крыс с уровнем функциональной активности иммунокомпетентных клеток [17], показателей иммунного статуса с интенсивностью процессов свободнорадикального окисления [18] и об обратной корреляционной зависимости между показателями свободнорадикальной активности и поведенческими реакциями крыс [19], можно заключить, что экспериментальные животные с высоким уровнем ОИП имеют низкие уровни продуктов перекисидации при активной иммунной системе

Таблица 1. Изменение объема опухолевого узла и коэффициента абсолютного прироста опухоли у крыс без воздействия и после проведенной терапии

Группа животных	Исходный объем опухоли, см ³	Объем опухоли, см ³		Случаи регресса опухоли	K прироста опухоли
		Сутки после перевивки			
		10 (до лечения)	20 (после лечения)		
РА	0.52 – 4.19	1.40 [1.02; 2.81]	20.83 [4.68; 35.43]	0/6	7.56 [3.59; 11.61]
ФДТ		1.77 [1.77; 2.57]	12.22 [0.00; 33.27]	3/6	1.92 [-1.00; 17.80]
ОФР		2.03 [1.77; 2.81]	15.92 [5.20; 32.61]	1/6	4.13 [1.94; 17.42]
ФДТ + ОФР		1.91 [0.52; 4.19]	3.32 [1.76; 7.58]	2/5	0.42* [-0.41; 5.44]

Примечание. * – $p < 0.05$ по сравнению с группой без воздействия (РА) по U -критерию Манна–Уитни

Таблица 2. Интенсивность роста карциномы почки РА в случаях продолженного роста ($K \geq 0$)

Группа животных	Кол-во животных без регрессии опухоли	Коэффициент прироста опухоли
РА	6	7.56 [3.59; 11.61]
ФДТ	3	17.26 [4.83; 28.79]
ОФР	5	4.88 [3.39; 17.45]
ФДТ + ОФР	3	3.49 [0.42; 11.17]

Таблица 3. Параметры ориентировочно-исследовательского поведения аутбредных белых крыс SD в тесте «Открытое поле»

Группа животных	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность			Ориентировочно-исследовательская активность
	Периферическая	Центральная	Суммарная	Свободная	С опорой на стенку	Суммарная	
1 ($n = 25$)	210 [195; 221]	18 [13; 23]	227 [209; 242]	2 [1; 5]	10 [8; 11]	11 [10; 16]	237 [219; 253]
2 ($n = 57$)	155 [143; 164]*	12 [7; 17]	168 [152; 177]*	2 [0; 4]	7 [4; 11]	9 [5; 13]	175 [161; 186]*
3 ($n = 23$)	104 [74; 125]*^	6 [4; 13]*	117 [84; 134]*^	1 [0; 3]	5 [2; 7]*	5 [4; 9]*	126 [88; 142]*^

Примечание. 1 – группа животных с высоким уровнем ОИП; 2 – группа животных со средним уровнем ОИП; 3 – группа животных с низким уровнем ОИП; * – $p < 0.001$ относительно группы 1, ^ – $p < 0.001$ относительно группы 2 по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

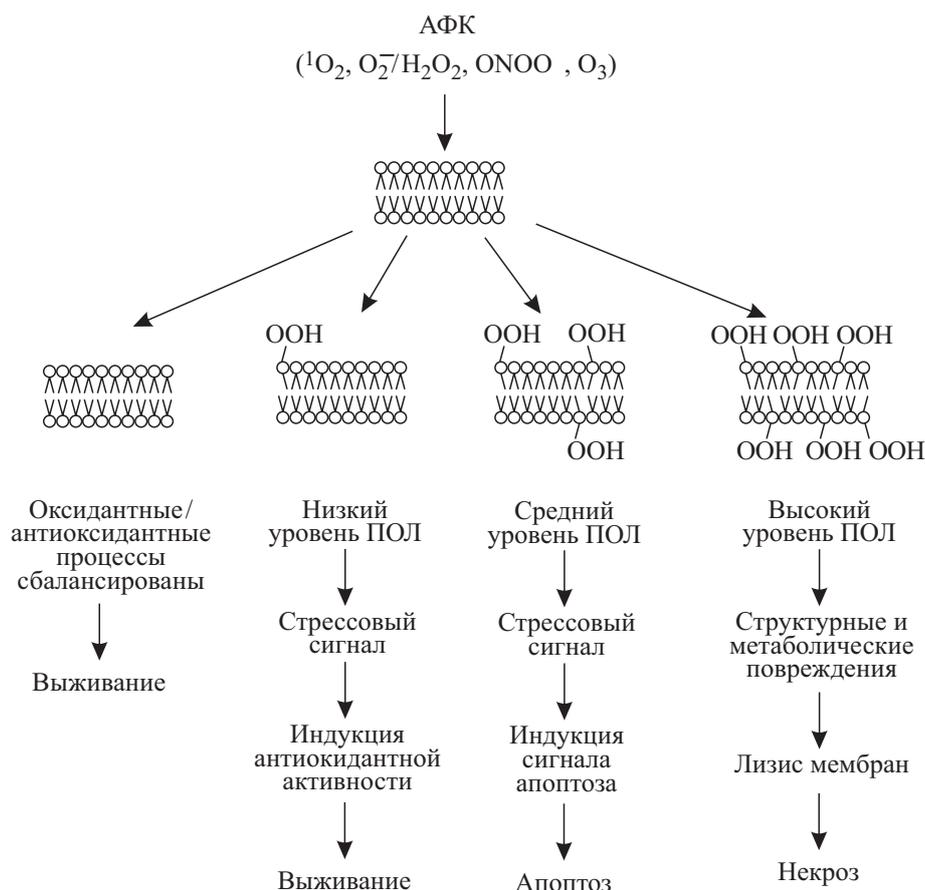


Рис. 1. Зависимость реакции клеток на воздействие активных форм кислорода от интенсивности процессов перекисного окисления липидов (модифицировано из работы [20]).

организма. Реакция клеток на воздействие активных форм кислорода зависит от интенсивности процессов перекисного окисления липидов (рис. 1) [20], и фотодинамическое воздействие на опухоль с исходно низким уровнем свободнорадикального окисления, вероятно, привело к индукции антиоксидантной активности в опухолевых клетках и их выживанию. Локальное же повышение уровня свободнорадикального окисления в опухолевом очаге, возможно, способствовало снижению уровня местного иммунитета. Все это в результате и привело к интенсификации роста карциномы РА при фотодинамическом воздействии.

Стоит отметить, что для животных-опухоленосителей без воздействия с исходно высоким уровнем ОИП были характерны самые низкие показатели коэффициента прироста опухоли. У крыс с исходно низкой горизонтальной и вертикальной двигательной активностью трансплантированная карцинома почки росла более агрессивно.

После комбинированного действия ОФР и ФДТ регресс карциномы наблюдался в двух из пяти случаев (табл. 1), но при этом не было заре-

гистрировано стимуляции роста при разработанной нами схеме (табл. 2) и торможение роста опухоли было статистически значимо по сравнению с группой без воздействия (табл. 1). Мы предполагаем, что воздействие ОФР с выбранной концентрацией озона за счет образования активных форм кислорода, озонидов и запуска синтеза цитокинов [3] снизило устойчивость клеток карциномы к фотодинамическому воздействию. Вероятно, гибель опухолевых клеток в таком случае происходит даже при низком уровне генерации активных форм кислорода, тем самым преодолевается нежелательное цитостимулирующее действие ФДТ и повышается ее противоопухолевая эффективность.

Оценка изменений окислительного гомеостаза показала, что на 20-е сутки роста карциномы почки РА наблюдалось достоверное повышение содержания альдегид-ДФГ, полученных при спонтанном окислении, по сравнению с интактными крысами ($p < 0.025$) в гомогенатах печени животных-опухоленосителей (табл. 4). При металл-катализируемом окислении белка в ткани печени животных-опухоленосителей повышался

Таблица 4. Содержание альдегид-ДНФГ и кетон-ДНФГ в гомогенатах ткани печени крыс при спонтанном и индуцированном окислении

Группа животных	Содержание альдегид-ДНФГ, ед. опт. пл./1 мг белка		Содержание кетон-ДНФГ, ед. опт. пл./1 мг белка	
	Спонтанное окисление	Индуцированное окисление	Спонтанное окисление	Индуцированное окисление
Интактные	443 [338; 514]	461 [385; 674]	515 [411; 589]	558 [438; 800]
РА	642 [532; 850]*	729 [700; 871]*	774 [508; 1038]	855 [775; 920]*
ФДТ	496 [466; 625]	597 [494; 663]^	485 [404; 763]	587 [514; 700]^
ОФР	555 [396; 615]	629 [500; 874]	635 [416; 676]	586 [580; 986]
ФДТ + ОФР	500 [432; 558]	573 [465; 728]^	564 [532; 644]	682 [544; 889]

Примечание. * – $p < 0.04$ по сравнению с интактными животными, ^ – $p < 0.05$ по сравнению с животными-опухоленосителями без воздействия (РА) по U -критерию Манна–Уитни.

уровень альдегид-ДНФГ ($p < 0.015$) и кетон-ДНФГ ($p < 0.04$) по сравнению с интактными животными. Эти данные указывают на раннее развитие окислительного стресса в тканях печени опухоленосителей и истощение резервно-адаптационных возможностей ее клеток [13].

Усиление ОМБ в тканях печени на 20-е сутки роста опухоли РА частично можно объяснить снижением активности антиоксидантного фермента каталазы более чем в два раза ($p < 0.01$) (рис. 2) и снижением активности супероксиддисмутазы в тканях этого органа по сравнению с ин-

тактными крысами (рис. 3). Это может быть обусловлено оттоком антиоксидантных ферментов в опухолевый очаг [21].

Однако стоит отметить, что при этом на 20-е сутки развития опухоли в плазме крови животных не было выявлено статистически значимых различий в уровне ОМБ (табл. 5) на фоне 15%-го увеличения свободнорадикальной активности (рис. 4) и повышения содержания ТБК-активных продуктов (рис. 5), основным из которых является малоновый диальдегид, по сравнению с интактными крысами. Это говорит о том, что белки плазмы более устойчивы к окислению, чем белки печени, и могут прояв-

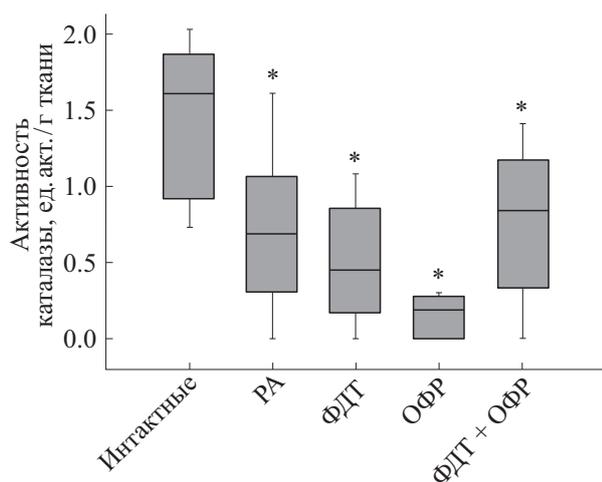


Рис. 2. Активность каталазы в гомогенатах печени крыс различных экспериментальных групп; * – $p < 0.01$ по сравнению с интактной группой по множественному критерию Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

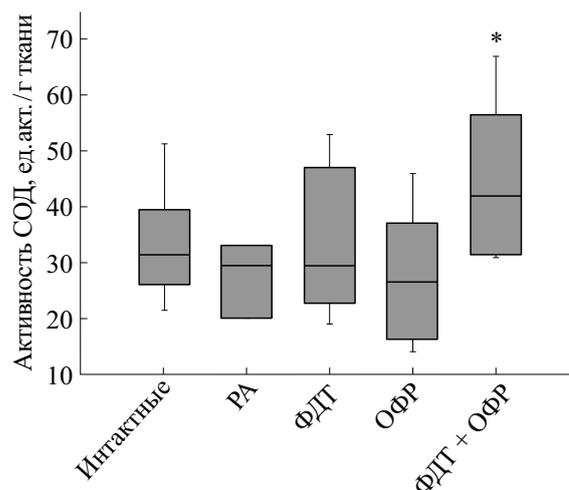


Рис. 3. Активность супероксиддисмутазы в гомогенатах печени крыс; * – $p < 0.05$ по сравнению с группой опухоленосителей (группа «РА») без воздействия по U -критерию Манна–Уитни.

Таблица 5. Содержание альдегид-ДНФГ и кетон-ДНФГ в плазме крови интактных животных и крыс-опухоленосителей

ОМБ, ед. опт. пл./мл плазмы	Группа животных	
	Интактные	РА
Альдегид-ДНФГ при спонтанном окислении	0.24 [0.23; 0.26]	0.22 [0.20; 0.25]
Альдегид-ДНФГ при индуцированном окислении	0.58 [0.54; 0.62]	0.60 [0.57; 0.70]
Кетон-ДНФГ при спонтанном окислении	0.29 [0.28; 0.31]	0.29 [0.25; 0.30]
Кетон-ДНФГ при индуцированном окислении	0.69 [0.66; 0.75]	0.72 [0.66; 0.77]

Таблица 6. Содержание альдегид-ДНФГ в гомогенатах селезенки при спонтанном и индуцированном окислении

Группа животных	Группа животных	
	Спонтанное окисление	Индуцированное окисление
Интактные	418 [388; 487]	646 [565; 806]
РА	443 [356; 520]	738 [501; 855]
ФДТ	514 [501; 546]*	823 [749; 862]*
ОФР	453 [330; 585]	644 [514; 790]
ФДТ + ОФР	550 [474; 716]*	868 [685; 1055]

Примечание. * – $p < 0.05$ по сравнению с интактными животными по U -критерию Манна–Уитни.

лять антиоксидантные свойства, что уже показано для билирубина [22] и альбумина [23]. Поэтому оценка ОМБ в плазме крови при опухолевом росте не является хорошим маркером состояния окислительного стресса.

Локальное фотодинамическое воздействие на опухоль привело к уменьшению окислительной напряженности в печени: статистически значимо снизился уровень альдегид-ДНФГ и кетон-ДНФГ при металл-катализируемом окислении белка по сравнению с животными-опухоленосителями без воздействия (табл. 4), что говорит о восстановлении адаптационных резервов в печени. Однако при моновоздействии ФДТ спровоцировала окислительное повреждение в тканях селезенки – повысился уровень альдегид-ДНФГ в гомогенатах ткани при спонтанном и металл-катализируемом окислении ($p < 0.05$) по сравнению с интактными крысами (табл. 6).

Инъекции ОФР с низкой концентрацией озона на фоне повышения свободнорадикальной активности плазмы крови (рис. 4) не вызывали роста уровня ОМБ в селезенке (табл. 6), но и не способствовали снижению повреждающего действия ФДТ в комбинации (табл. 6).

Следует отметить, что только после совместного применения ОФР и фотодинамического воздействия наблюдалось восстановление работы

антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и супероксиддисмутаза, в ткани печени (рис. 2 и 3). Это, скорее всего, связано не с прямым действием комбинированной терапии, а с подавлением роста опухолевого очага и уменьшением патологического влияния на печень. При этом наблюдалось статистически значимое снижение уровня индуцированных альдегид-ДНФГ в гомогенатах ткани печени (табл. 4) и значительное снижение процентильного размаха по данным ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс-опухоленосителей (рис. 5).

Резистентность опухолей к терапевтическим воздействиям, в основе которых лежит влияние на свободнорадикальные процессы, обусловлена устойчивостью бластотрансформированных клеток к окислительному стрессу за счет высокой активности антиоксидантных ферментов [21]. Окислительные воздействия, направленные на интенсификацию свободнорадикальных процессов в опухоли и преодолевающие ее гипоксию, могут спровоцировать гипероксическое состояние в целостном организме. Отсюда важно проводить комплексную оценку уровня свободнорадикального окисления с учетом тканеспецифичности, в частности, и индивидуальной особенности, в общем.

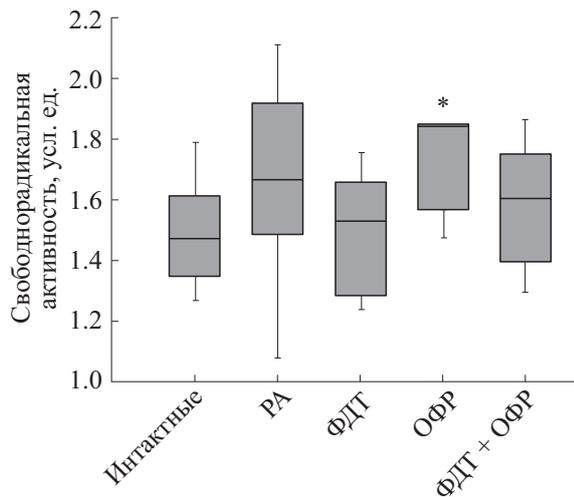


Рис. 4. Уровень свободнорадикальной активности плазмы крови крыс в различных экспериментальных группах; * – $p < 0.03$ по сравнению с интактной группой по U -критерию Манна–Уитни.

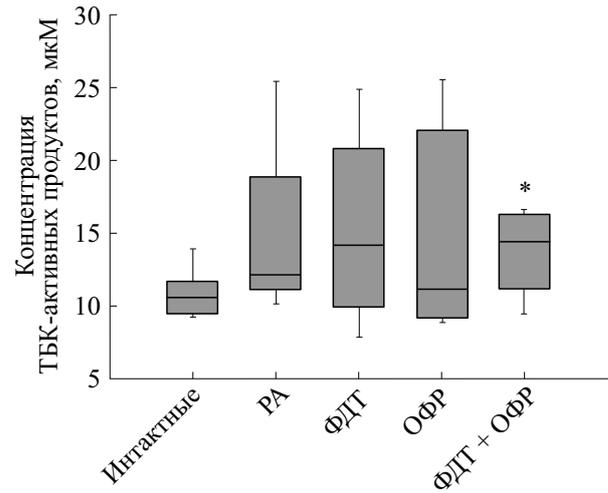


Рис. 5. Концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови крыс; * – $p < 0.02$ по сравнению с интактной группой по U -критерию Манна–Уитни.

Мы установили, что монофотодинамическое воздействие при интратуморальном введении 0.3% раствора «Фотосенса» из расчета 30% от объема опухоли и последующей активацией его светодиодным лазером может оказывать стимулирующее действие на рост неоплазии. При этом «группой риска» для такого ответа на экспериментальную терапию являются животные с исходно низким уровнем ориентировочно-исследовательской активности. Разработанный нами экспериментально-терапевтический метод, основанный на комбинированном действии озонированного физиологического раствора с концентрацией озона в озono-кислородной смеси 400 мкг/л и фотодинамического воздействия, снижает интенсивность опухолевого роста, снижает содержание продуктов ОМБ альдегид-ДФГ, повышает активность супероксиддисмутазы в печени, однако сохраняет высокий фон окислительных повреждений селезенки. Для повышения эффективности разрабатываемой схемы комбинированного применения озono-фотодинамического воздействия необходимы дальнейшие исследования в направлении оптимизации параметров озонотерапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта № 19-02-00667.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с животными проводили согласно рекомендациям, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и в соответствии с Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным (Эдинбург, 2000). Работа была одобрена Локальным этическим комитетом ПИМУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. В. Кузнецов, Исследования и практика в медицине **2** (4), 98 (2015).
2. А. Б. Гапеев и Т. Г. Щербатюк, Биол. мембраны **37** (2020) (в печати)
3. Т. Г. Щербатюк, Нижегородский мед. журн. **1**, 52 (2003).
4. Т. Г. Щербатюк, Фізіологіч. журн. **54**, 41 (2008).
5. Т. Г. Щербатюк, В. Д. Селемир и Е. С. Клинцева, Патент на изобретение RUS 2361590 (2007).
6. Е. С. Князева, Т. Г. Щербатюк, и А. Б. Гапеев, Вестн. физиотерапии и курортологии **25**, 37 (2019).
7. Я. Буреш, О. Бурешова и Д. П. Хьюстон, *Методика и основные эксперименты по изучению мозга и поведения* (Высш. шк., М., 1991).
8. Н. В. Вдовина, Е. С. Клинцева и Т. Г. Щербатюк, Современ. технологии в медицине **2**, 12 (2010).
9. Т. Г. Щербатюк, И. А. Чернигина, Е. С. Плеханова и А. Б. Гапеев, Актуальные вопросы биологической физики и химии **4**, 564 (2019).

10. С. Н. Буранов, В. В. Горохов, В. И. Карелин и В. Д. Селемир, Патент на изобретение RUS 2249445 (2003).
11. Е. В. Ярославцева-Исаева, М. А. Каплан, Ю. С. Романко и др., Рос. биотерапев. журн. **2**, 19 (2003).
12. К. Е. Коптяева, А. А. Мужикян, Я. А. Гущин и др., Лабораторные животные для научных исследований **2**, 71 (2018).
13. Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, Е. Л. Левицкий и др., Соврем. проблемы токсикологии **8**, 20 (2005).
14. А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина и Н. Н. Зыбина, Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма (ИКФ «Фоллиант», СПб., 2000).
15. Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов и И. С. Поротов, Вопр. мед. химии **41**, 24 (1995).
16. Е. И. Кузьмина, А. С. Нелюбин и М. К. Шенникова, в сб. *Биохимия и биофизика микроорганизмов* (ГГУ, Горький, 1983), сс. 41–48.
17. Е. В. Маркова, *Поведение и иммунитет* (НГПУ, Новосибирск, 2013).
18. Б. Л. Жаркой, в сб. *Свободные радикалы, антиоксиданты и здоровье животных* (Воронежский гос. ун-т, Воронеж, 2004), сс. 36–40.
19. Ю. В. Никитина, Автореферат дис. ... к-та биол. наук (Нижегород. государ. университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород 2009).
20. W. Girotti, *J. Lipid Res.* **39**, 1529 (1998).
21. Ю. П. Козлов, *Свободные радикалы и их роль в нормальных и патологических процессах* (МГУ, М., 1973).
22. Л. Б. Дудник, Л. М. Виксна и А. Я. Майоре, Вопр. мед. химии **46**, 597 (2000).
23. М. М. Созарукова, Е. В. Проскурина и Ю. А. Владимиров, Вестн. РГМУ **1**, 61 (2016).

Oxidative Modification of Proteins in Tissues of Tumor-Bearing Rats after Ozone-Photodynamic Therapy

T.G. Shcherbatyuk*, **, E.S. Zhukova (Plekhanova)*, Ju.V. Nikitina*, and A.B. Gapeyev***

*Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

**Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Rat renal carcinoma was used as the model to study ozone-photodynamic effects on the rate of tumor growth and oxidative modification of proteins in rat tissues. In this study, we explore the utility of the experimental method for therapeutic benefits to test a combination of the ozonated physiological saline solution and Photosens photosensitizer for parenteral administration. Results indicated that the intraperitoneal injection of a gaseous oxygen-ozone mixture with an ozone concentration of 400 µg/L in ozonated physiological saline and intratumoral administration of 0.3% Photosens solution with local exposure to light at a wavelength of 660 ± 10 nm for 10 min cause a decrease in tumor growth rate. Combined treatment with ozonated physiological saline and photodynamic therapy led to a normalization of the prooxidant /antioxidant balance in animals used for experiments.

Keywords: photodynamic therapy, ozonated physiological saline, oxidative stress, oxidative modification of proteins, experimental kidney carcinoma, outbred rats

УДК 577.3; 57.04; 616.8; 615.27

ПРИМЕНЕНИЕ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ МЕТАБОЛИЗМА ЖЕЛЕЗА ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2020 г. Г.Т. Рихирева*, М.Г. Маклецова**

*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.Семенова РАН,
119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: grikhireva@bk.ru

**Донской государственный технический университет, 344000, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1

E-mail: mgn52@bk.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 22.12.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

Представлен краткий обзор работ авторов по применению низкотемпературной ЭПР-спектроскопии в исследованиях крови пациентов с болезнью Паркинсона и тканей органов крыс, взятых в экспериментах, моделирующих ранние стадии паркинсонизма. Анализ полученных и литературных данных позволяет предположить, что процесс деградации гемоглобина можно включить в перечень фундаментальных характеристик патогенеза болезни Паркинсона.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, ЭПР-спектроскопия, метаболизм железа, гемоглобин.

DOI: 10.31857/S0006302920020210

В работе биохимических систем органов и тканей животных и человека участвуют парамагнитные металлокомплексы и свободнорадикальные соединения, которые характеризуются специфическими спектрами электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Метод низкотемпературной ЭПР-спектроскопии является одним из сравнительно быстрых способов зарегистрировать изменения в метаболическом состоянии органов и тканей. Он имеет ряд преимуществ перед трудоемкими биохимическими методами в исследовании молекулярно-клеточных механизмов функционирования организма, поскольку позволяет исследовать цельные ткани органов без нарушения их структуры, а быстрое и глубокое замораживание (до 77 К) обеспечивает фиксацию состояния исследуемых объектов. Кроме того, на одних и тех же образцах можно получить информацию о сдвигах в нескольких биохимических системах, что позволяет делать как конкретные, так и более общие заключения о реакции организма на стрессорные воздействия различной природы (патологии, облучение, химические соединения и т.д.) и о механизмах защиты при использовании лекарственных препаратов. По ЭПР-спектрам тканей можно оценить состояние

дыхательной цепи митохондрий, состояние содержащей цитохром Р-450 гидроксидирующей системы, активацию процессов биосинтеза дезоксирибонуклеотидов и др.

Болезнь Паркинсона — хроническое, мультифакторное, возраст-зависимое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга и дефицитом дофамина в nigrostriatной системе. На клеточном уровне болезнь Паркинсона характеризуется интенсификацией окислительного стресса, снижением уровня глутатиона, дисфункцией митохондрий и метаболизма железа и увеличением его содержания в черной субстанции мозга [1–6].

Метаболитами железа, обладающими парамагнитными свойствами, являются метгемоглобин (MetHb) и переносчики железа белки Cu^{2+} -церулоплазмин и Fe^{3+} -трансферрин. Спектры ЭПР крови пациентов с болезнью Паркинсона и тканей экспериментальных животных нами были измерены при 77 К на радиоспектрометре ER-220D фирмы Bruker (Германия). Содержание парамагнитных белков определяли как величину, пропорциональную амплитуде сигналов ЭПР с g -фактором 2.05 для церулоплазмина, с g -фактором 4.3 для трансферрина и с g -фактором 6.0 для MetHb.

Сокращения: ЭПР — электронный парамагнитный резонанс, MetHb — метгемоглобин, МРТР — 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

К настоящему времени участие окислительного стресса в развитии старения и возрастных нейродегенеративных заболеваний является общепринятым [2]. Редокс-активные ионы железа являются одними из главных индукторов окислительного стресса в тканях. Механизмы и источники накопления железа в черной субстанции мозга при болезни Паркинсона до сих пор не выяснены. Эти вопросы представляют особый интерес для выяснения триггерных этапов патогенеза заболевания, поскольку аномальное повышение содержания железа в субстанции нигра у пациентов с болезнью Паркинсона наблюдается на самых ранних стадиях заболевания [6]. Следует отметить, что определенное повышение содержания железа в субстанции нигра наблюдается и при естественном старении [7]. Пул железа в организме в значительной степени поддерживается в результате вторичного использования железа после катаболических процессов при разрушении железосодержащих белков, главным образом, гемоглобина. В физиологических условиях имеет место спонтанное окисление гемоглобина с образованием активных форм кислорода. Образование метгемоглобина (MetHb) является начальной стадией дегградации гемоглобина. Восстановление функционального оксигемоглобина, способного переносить газообразный кислород в ткани, в норме осуществляется с участием восстановленного глутатиона, содержание которого снижено у больных болезнью Паркинсона [6].

Мыши с ускоренным темпом старения являются адекватной моделью для изучения патогенеза возраст-зависимых нейродегенеративных заболеваний. В основе возрастных изменений линии быстростареющих мышей SAMP1 (Senescence-Accelerated Mouse Prone) лежит нарушение антиоксидантного статуса в организме: значительно уменьшена активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы) и снижено содержание низкомолекулярных антиоксидантов (глутатиона, карнозина, таурина и др.). Проведя сравнительное исследование влияния гипобарического стресса на двух линиях мышей с обычным (SAMR1; Senescence-Accelerated Mouse Resistant) и ускоренным темпом старения (SAMP1), мы обратили внимание на то, что в крови быстростареющих мышей после эпизода стресса наблюдается значительное накопление MetHb (на 62%) по сравнению с мышами SAMR1, у которых такая реакция отсутствовала [8]. Этот факт побудил нас исследовать содержание MetHb в крови пациентов с болезнью Паркинсона [9]. В эритроцитах больных с болезнью Паркинсона (на третьей-четвертой стадии) было выявлено значительное (в пять раз; $p \leq 0.001$) увеличение содер-

жания MetHb по сравнению с донорами той же возрастной группы.

Повышение уровня MetHb создает условия возникновения гипоксии в тканях. Установлено, что метгемоглобинемия в два раза сильнее по сравнению со снижением тканевого уровня кислорода подавляет дыхательную функцию крови [10].

В ряде работ обсуждается роль MetHb в развитии нейродегенеративных заболеваний как биомаркера и как индуктора окислительного стресса. Более того, есть наблюдения о связи риска нейродегенерации у потомства матерей с метгемоглобинемией во время беременности [11].

В литературе сообщались данные о падении содержания гемоглобина в крови пациентов с болезнью Паркинсона [12], что может быть связано как со снижением уровня биосинтеза белка, так и с усилением его катаболизма. Вопрос о том, снижение синтеза гемоглобина или усиление его распада является причиной снижения уровня гемоглобина у больных болезнью Паркинсона, дискутируется в литературе [6].

В недавней работе [13] было обнаружено, что более низкие уровни гемоглобина в крови пациентов с болезнью Паркинсона связаны с тяжестью заболевания и с изменениями в метаболизме железа: по содержанию железа, ферритина и общей связывающей способности железа.

Установленный нами факт увеличения содержания MetHb при добавлении в суспензию эритроцитов индукторов окислительного стресса (акролеин, дофамин) и предотвращения этого эффекта с помощью эндогенного антиоксиданта карнозина позволил нам рассматривать MetHb как биомаркер окислительного стресса [14]. Следует отметить, что при болезни Паркинсона наблюдается резкое увеличение содержания акролеина в субстанции нигра [15].

В настоящее время фактически установлено, что окислительный стресс играет ведущую роль в индукции нейродегенеративных процессов. Считается, что отношение церулоплазмин/трансферрин отражает способность сыворотки крови улавливать и секвестрировать металлы переменной валентности (железо и медь), которые активно участвуют в развитии окислительного стресса [16]. Исследуя содержание и отношение белков Cu^{2+} -церулоплазмин/ Fe^{3+} -трансферрин в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона на разных стадиях заболевания, мы обнаружили, что исследуемый показатель выше в крови пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению с контролем той же возрастной группы за счет увеличивающегося содержания церулоплазмина и тенденции к снижению насыщенности трансферрина

железом. В группах больных, получавших и не получавших заместительную L-ДОФА-терапию, прослеживалась тенденция к постепенному увеличению отношения исследуемых белков при прогрессировании заболевания: от 119% ($p \leq 0.01$) на первой стадии до 189% ($p \leq 0.001$) на четвертой стадии по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о наличии при болезни Паркинсона изменений в функционировании системы, обеспечивающей снижение содержания токсичных ионов Fe^{2+} в плазме, и эти изменения являются одним из патогенетических факторов болезни Паркинсона на всех стадиях заболевания [17].

Поскольку болезнь Паркинсона является неизлечимым и прогрессирующим заболеванием, то особое значение имеет его ранняя диагностика. Для исследования механизмов начальных так называемых «домоторных» стадий патогенеза болезни Паркинсона широко используются экспериментальные модели болезни на животных, поскольку клиническая симптоматика становится очевидной только на развернутой стадии заболевания, когда нейродегенерации подвергаются уже 60–80% дофаминергических нейронов. Во многих работах в качестве экспериментального индуктора паркинсонизма используют низкие дозы нейротоксина МРТР (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine). При участии фермента моноаминоксидазы типа В МРТР метаболизируется в астроцитах в его активный нейротоксичный метаболит МРР+ (1-метил-4-фенил-2,3-дигидропиридин). Ион МРР+ избирательно поглощается дофаминергическими нейронами благодаря его сродству к транспортеру дофамина, что обуславливает селективность повреждающего действия этого соединения [18].

В работе [19] была описана и обоснована схема получения модели ранней премоторной («домоторной») стадии паркинсонизма у крыс. Она создается после однократной интракраниальной инъекции МРТР (100 мкг) в черную субстанцию мозга, в результате чего имеет место частичная дегенерация дофаминергических нейронов с умеренным уменьшением уровня дофамина в nigrostriatной системе. В описанной модели паркинсонизма через три недели после операции наблюдали депрессивноподобное состояние животных и когнитивные нарушения. Двигательные нарушения отсутствовали. Таким образом, ранняя премоторная стадия болезни Паркинсона характеризуется эмоциональными и когнитивными нарушениями.

Для выяснения состояния животных в премоторной стадии паркинсонизма мы провели измерение спектров ЭПР образцов крови, селезенки, мозжечка и продолговатого мозга, взятых у крыс,

подвергнутых однократному интракраниальному введению нейротоксина МРТР по схеме, аналогичной описанной в работе [19]. Выбор селезенки как объекта изучения был обусловлен тем, что в этом органе с помощью гем-оксигеназной системы происходит окончательное разрушение гемоглобина (MetHb) с выделением свободных ионов железа, монооксида углерода и билирубина.

Эксперименты были проведены на 15 крысах-самцах линии Вистар [20]. Животных подвергали однократному интракраниальному введению МРТР для создания модели премоторной стадии болезни Паркинсона. Исследовали следующие группы животных: группа 1 («Контроль») – животные, которым вводили однократно интракраниально 8 мкл физиологического раствора билатерально в черную субстанцию ($AP = 5.2$ мм, $ML \pm 2$ мм, $DV = 7.7$ мм); группа 2 («Введение МРТР») – животные, которым вводили однократно интракраниально МРТР (30 мкг в 8 мкл физиологического раствора) билатерально в черную субстанцию. На 23-и сутки после введения МРТР животных декапитировали. Образцы крови и тканей селезенки, мозжечка и продолговатого мозга замораживали в жидком азоте для последующего измерения спектров ЭПР. Содержание гемоглобина в крови определяли по методу Драбкина (использовали реактивы ООО «Агат-Мед», Москва) и выражали в мг на мл крови. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в соответствии с общепринятыми методами статистики и выражали в средних значениях \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки достоверности обнаруженных изменений применяли тесты Манна-Уитни.

Измерения показали, что однократное интракраниальное введение крысам нейротоксина МРТР через 23 суток вызывает падение концентрации гемоглобина и MetHb в периферической крови на 25% ($p \leq 0.06$) и 43% ($p \leq 0.06$) соответственно, а также увеличение содержания MetHb в селезенке на 92% ($p \leq 0.06$) по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о том, что регистрируемое в исследуемой экспериментальной модели падение уровня гемоглобина в крови крыс по времени соответствует значительной активации процесса дегградации гемоглобина (увеличение содержания MetHb в селезенке почти вдвое по сравнению с контролем). В спектрах ЭПР образцов тканей мозжечка и продолговатого мозга, взятых у крыс с введенным МРТР, полностью отсутствовали отчетливо регистрируемые в норме [21] сигналы ЭПР компонентов дыхательной цепи переноса электрона в митохондриях. Этот факт является показателем дисфункции митохондрий на ранних стадиях экспериментального паркинсонизма.

В качестве подтверждения вывода об активации катаболизма гемоглобина при болезни Паркинсона, по-видимому, можно рассматривать результаты недавних работ об изменении концентрации общего билирубина в крови пациентов с болезнью Паркинсона [22, 23]. Исследуя несколько групп больных с различными стадиями заболевания (по шкале НУ всего пять стадий), они обнаружили, что группы с НУ ≤ 3 имеет более высокий уровень билирубина по сравнению со здоровым контролем. Авторы предполагают, что повышение уровня билирубина связано с активацией фермента гем-оксигеназы на ранних стадиях болезни Паркинсона [24].

Таким образом, применение низкотемпературной ЭПР-спектроскопии в изучении метаболизма железа при болезни Паркинсона на образцах крови и суспензии эритроцитов пациентов с болезнью Паркинсона позволило установить, что MetHb является биомаркером окислительного стресса. По уровню MetHb в тканях можно судить о наличии окислительного стресса, о создании гипоксических условий в организме и об интенсификации процесса деградации гемоглобина. Данные, полученные в опытах с животными, которые были подвергнуты воздействию индуктора паркинсонизма (МРТР), позволили установить, что на ранних премоторных стадиях паркинсонизма регистрируется активация деградации гемоглобина (кровь, селезенка) и отключение митохондриальной дыхательной цепи переноса электрона в тканях мозга (мозжечок, продолговатый мозг).

Полученные данные представляют интерес для выяснения механизмов патогенеза болезни Паркинсона.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Минобрнауки России (тема 0082-2014-0001 № АААА-А17-117040610310-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Jiang, J. Wang, J. Rogers, and J. Xie, *Mol. Neurobiol.* **54**, 3078 (2017). DOI: 10.1007/s12035-016-9879-1.
2. S. R. Danielson and J. K. Andersen, *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1787 (2008).
3. O. Hwang, *Exp. Neurobiol.* **22**, 11 (2013).
4. J. Blesa, I. Trigo-Damas, and A. Quiroga-Varela, *Front Neuroanat.* **9**, 91 (2015).
5. G. H. Kim, J. E. Kim, S. J. Rhie, et al., *Exp. Neurobiol.* **24** (4), 325 (2015).
6. J. Freed and L. Chakrabarti, *npj Parkinson's Disease* **2**, 16021 (2016) DOI: 10.1038/npjparkd.2016.21.
7. R. D. Abbott, G. W. Ross, C. M. Tanner, et al., *Neurobiol. Aging* **33**, 914 (2012).
8. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, С. Л. Стволинский и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **152** (9), 330 (2011).
9. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, В. В. Полещук и др., *Биомед. химия* **62** (2), 193 (2016).
10. Б. Л. Курляндский и В. А. Филов, *Общая токсикология* (М., 2002).
11. L. Mohorovic, F. M. Lavezzi, S. Stifter, et al., *Adv. Biosci. Biotechnol.* **5** (1), 2014).
12. R. Savica, B. R. Grossardt, J. M. Carlin, et al., *Neurology* **73**, 1381 (2009).
13. Q. Deng, X. Zhong, J. Chen, et al., *Brain Res.* **1655**, 145 (2017).
14. М. Г. Маклецова, Т. Н. Федорова, В. В. Полещук и Г. Т. Рихирева, *Биофизика* **62** (2), 319 (2017).
15. A. Moghe, S. Ghare, V. Lamoreau, et al., *Toxicol. Sci.* **143** (2), 242 (2015).
16. А. В. Козлов, В. И. Серпиенко, Ю. А. Владимиров и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **98**, 668 (1984).
17. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, В. В. Полещук и С. Н. Иллариошкин, *Биофизика* **62** (6), 1204 (2017).
18. С. Н. Иллариошкин, Л. Г. Хаспеков и И. А. Гривенников, *Моделирование болезни Паркинсона с использованием плюрипотентных стволовых клеток* (М., 2016).
19. А. В. Непоклонов, И. Г. Капица, Е. А. Иванова и др., *Нейрофармакология* **75** (11), 3 (2012).
20. М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, К. В. Грякалов и др., *Асимметрия* **12** (4), 336 (2018).
21. М. К. Пулатова, Г. Т. Рихирева и З. В. Куроптева, *Электронный парамагнитный резонанс в молекулярной радиобиологии* (Энергоатомиздат, М., 1989).
22. M. Moccia, M. Picillo, R. Erro, et al., *Eur. J. Neurol.* **22**, 954 (2015).
23. Macias-Garcia, C. Méndez-Del Barrio, S. Jesús, et al., *Parkinsonism and Related Disorders* **63**, 213 (2019). DOI: 10.1016/j.parkreldis.2019.01.012.
24. M. F. McCarty, *Med. Hypotheses* **81**, 607 (2013).

Application of EPR-Spectroscopy in Studies of Iron Metabolism in Parkinson's Disease**G.T. Rikhireva* and M.G. Makletsova******Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia****Don State Technical University, pl. Gagarina 1, Rostov-on-Don, 344000 Russia*

In this paper, we presented an overview of our researches on the use of EPR spectroscopy at low temperature in studies of the blood of patients with Parkinson's disease and tissues of rat models that mimic parkinsonism at early stages. Analysis of data from the experiments and literature suggests that the degradation process of hemoglobin can be considered one of the fundamental characteristics of Parkinson's disease pathogenesis.

Keywords: Parkinson's disease, EPR spectroscopy, iron metabolism, hemoglobin

УДК 638.141

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕПЛОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПЧЕЛИНОМ УЛЬЕ С ЭЛЕКТРОПОДОГРЕВОМ

© 2020 г. С.В. Оськин, Д.А. Овсянников

Кубанский государственный аграрный университет им. академика И.Т. Трубилина,
350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

E-mail: kgauet@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2019 г.

После доработки 18.11.2019 г.

Принята к публикации 20.11.2019 г.

Чтобы помочь пчелам легче преодолеть периоды резкого похолодания и сократить потребление меда пчелиной семьей, применяют электрический обогрев ульев. Однако недостаточность знаний по поведению зимней агрегации пчел приводит иногда к гибели семьи или повышенному расходу меда. В работе приводятся результаты моделирования физических процессов в улье с помощью программного обеспечения Comsol 5.3. Моделирование происходило как при фиксированной наружной температуре с переменной мощностью нагревателей, так и при фиксированных мощностях нагревателей и переменной температуре окружающего воздуха. Анализ термограмм показал, что при включении нагревателей зоны с максимальной температурой в клубе смещаются в нижнюю его часть, что объяснимо с биологической точки зрения. Также видно, что при включенных нагревателях положительные температуры занимают больший объем внутри улья и, следовательно, для пчел есть лучшая возможность перехода на новые кормовые запасы, что особенно важно в весенний период. В результате моделирования установлено, что при низких температурах пчелы сокращают выделение энергии с 3600 Вт/м^3 до 1900 Вт/м^3 , т. е. почти в два раза. Такое сокращение выделяемой мощности пчелами приведет и к сокращению потребления ими меда. Еще одним этапом моделирования была оптимизация подводимой мощности к нагревателям по критериям минимального колебания температуры внутри улья и недопустимости перегрева нагревателей.

Ключевые слова: пчела, улей, температура, моделирование, электрический обогрев.

DOI: 10.31857/S0006302920010222

Многими исследователями доказаны терморегуляторные способности зимнего клуба пчел [1–5]. В то же время установлено, что для поддержания комфортной температуры пчелы используют медовые запасы улья. Если меда в улье недостаточно, то пчелы могут погибнуть. Для сокращения потребления кормовых запасов пчелиной семьей и преодоления периодов с резкими похолоданиями применяют электрические обогреватели. Для пчеловодов на рынке можно увидеть большое количество разнообразного оборудования, предназначенного для обогрева ульев в зимний период. Однако сегодня нет полной уверенности в том, что при использовании электрических подогревателей пчелы успешно перезимуют. Так, применение электрообогрева может привести к чрезмерному повышению температуры в улье, и тогда у пчел значительно ускорится метаболизм [6]. Такое состояние провоцирует раннюю закладку яиц пчелиной маткой, что при похолоданиях увеличивает подмор или даже приво-

дит к гибели пчелиной семьи. В это же время семьи без подогрева успешно зимовали. Некоторые пчеловоды говорят, что применение обогрева привело к повышенному расходу меда и к небольшому эффекту по подмору. Также нужно отметить, что все это сопровождается расходом электроэнергии и неудобствами в обслуживании — прокладка проводов, установка нагревателей и т. д. Другая часть пчеловодов приводит данные о хорошей зимовке пчел и выходе из зимы сильных семей с большим количеством расплода. Такие неоднозначные данные говорят о недостаточной изученности поведения пчел зимой и связанной с этим неадекватной регулировкой режимов обогрева.

Несмотря на большие трудности измерения параметров микроклимата в улье и внутри зимнего клуба, имеются попытки по разработке и установке различных датчиков [7, 8]. В последнее время появились программные продукты, которые позволяют смоделировать основные теплофизи-

ческие процессы, протекающие в улье. При этом необходимо правильно подобрать геометрию улья, сформулировать адекватную целевую функцию и принять правомочные ограничения. Моделированию тепловых процессов посвящали свои работы В.А. Тобоев, Е.К. Еськов, М.С. Толстов [9–11]. В Кубанском ГАУ также занимаются исследованием поведения пчел и моделированием физических процессов в среде Comsol [12, 13]. На основании полученных решений математических моделей были обнаружены критические зоны в ульях, определены основные теплофизические характеристики зимнего клуба пчел и их зависимости от параметров окружающей среды. Были проанализированы воздухообмен улья и, отдельно, зимней агрегации пчел. Все это привело к выводу о необходимости применения локального электрообогрева с дифференцированным регулированием подводимой мощности. Таким образом, возникает цель исследования – провести моделирование микроклимата в пчелином улье с

электрообогревателями и установить рациональные параметры и режимы работы системы управления.

МОДЕЛЬ

В предыдущей работе [12] авторами был проведен анализ физических процессов, протекающих в улье, на примере семьи скоплением 15000 пчел, расположенных в двенадцатипрамочном улье дадановского типа. Моделирование проводили в пакете Comsol с применением интерфейсов «Heat Transfer», «Transport of Diluted Species» «Laminar Flow», необходимые параметры которых объединялись через мультифизические связи. Для исследования состояния микроклимата зимней агрегации пчел с применением электрообогрева тепловая модель была дополнена необходимыми функциональными характеристиками и стала иметь следующий вид:

$$\begin{cases} \rho_{\text{air1}} \cdot c_{\text{air1}} \cdot u_{\text{air1}} \cdot \nabla T + \rho_{\text{air2}} \cdot c_{\text{air2}} \cdot u_{\text{air2}} \cdot \nabla T + \rho_{\text{el h}} \cdot c_{\text{el h}} \cdot u_{\text{air1}} \cdot \nabla T + \nabla q_{\text{air1}} + \nabla q_{\text{air2}} + \\ \nabla q_{\text{wood}} + \nabla q_{\text{hc}} + \nabla q_{\text{empty hc}} + \nabla q_{\text{bee}} \text{Nu} + \nabla q_{\text{el h}} = Q_{\text{bee}} + Q_{\text{el h}}, \\ \lambda_{\text{bee}} = 0,0076 - 0,0017 \cdot T_0; \rho_{\text{пч}} = 243 - 8 \cdot T_0, \\ Q_{\text{bee}} = 3,2 \cdot T_0^2 - 20 \cdot T_0 + 922, \\ q_i = -\lambda_i \Delta T, \\ Q_{\text{el h}} = f(T_{\text{out}}), \end{cases} \quad (1)$$

где ρ_{air1} и ρ_{air2} – плотности воздуха, поступающего соответственно снаружи (индекс 1) и проходящего через пчелиный клуб (индекс 2); c_{air1} и c_{air2} – соответственно теплоемкости воздуха первого и второго воздушных блоков (внутреннего воздуха и воздуха внутри клуба); u_{air1} и u_{air2} – соответственно поля скоростей первого и второго воздушных блоков, м/с; q_{air1} , q_{air2} , q_{wood} , q_{hc} , $q_{\text{empty hc}}$, q_{bee} – соответственно плотности теряемых тепловых потоков путем теплопроводности воздушных блоков 1 и 2, деревянных элементов, медовых сот, пустых сот, пчелиного клуба, Вт/м²; T – текущее значение температуры (переменный параметр); T_0 – температура окружающего воздуха, контролируемая пчелами; T_{out} – температура наружного воздуха за ульем; λ_{bee} – коэффициент удельной теплопроводности агрегации пчел; $\rho_{\text{пч}}$ – плотность агрегации пчел; q_i и λ_i – соответственно плотности тепловых потоков и теплопроводности i -х составляющих объекта исследования (элементы улья и агрегация пчел); Nu – число Нуссельта; $\rho_{\text{el h}}$ и $c_{\text{el h}}$ – соответственно плотность и теплоемкость электронагревателя; $q_{\text{el h}}$ – плотность теряемого электронагревателем теплового потока пу-

тем теплопроводности; Q_{bee} – удельная тепловая мощность, воспроизводимая пчелами; $Q_{\text{el h}}$ – интенсивность тепловыделения электронагревателя.

Остальные разработанные модели – движения воздуха и влажности – оставались без изменения, как в предыдущей работе [12]. Была изменена геометрическая модель улья – добавлены три пленочных нагревательных элемента (рис. 1). Известно, что размер зимнего клуба пчел зависит от температуры наружного воздуха [14]. Используя приведенную в работе [12] зависимость плотности пчел от температуры, изменяли и геометрические размеры клуба.

Как видно из рис. 1, нагреватели располагались на дне улья с небольшим воздушным зазором для прохода воздуха. Решение моделей проводили с учетом мультифизических связей между отдельными интерфейсами. В ходе моделирования вычисляли температуру, скорость воздуха и концентрацию влаги во всех точках улья и внутри агрегации пчел. Геометрические параметры улья и его конструктивных элементов брали по размерам дадановского улья с двенадцатью рамками. Геометрические размеры зимней агрегации пчел

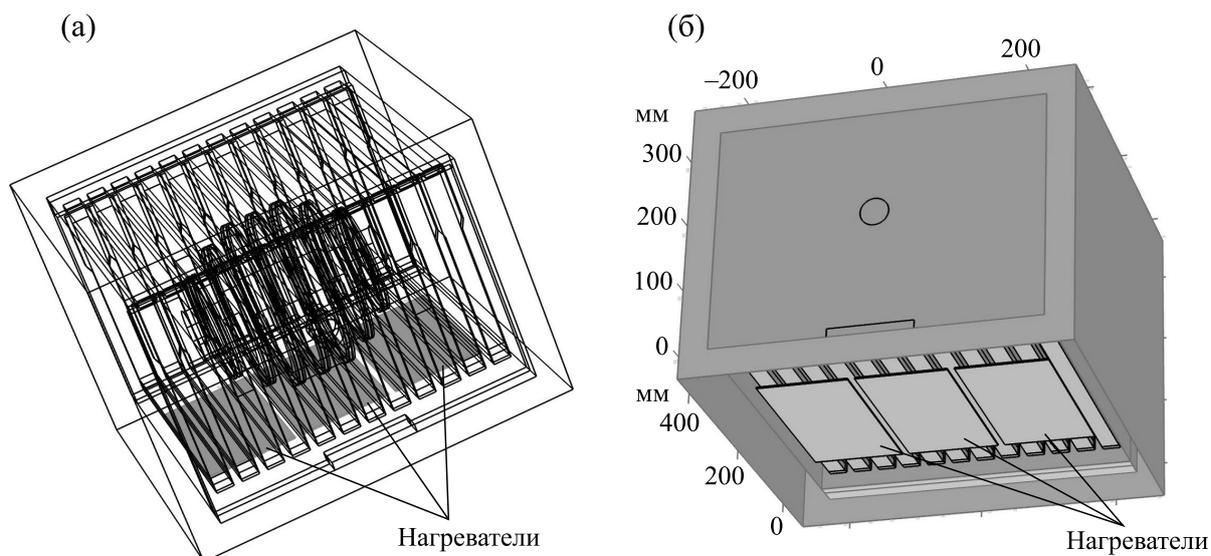


Рис. 1. Геометрия улья с установленными электрическими нагревателями.

были взяты на основе средней геометрии клуба с количеством пчел в 15000 особей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Моделирование проводили в два этапа: при фиксированной наружной температуре окружающего воздуха T_{out} (-25°C) и переменной тепловой мощностью, подводимой к нагревателям $Q_{el h}$; при фиксированных мощностях в нагревателях и переменной температуре окружающего воздуха T_{out} (принималась от 0°C до -30°C). В качестве температуры T_0 принимали температуру поверхностей нижних частей сотовых рамок, так как здесь имелось наибольшее соответствие с температурой окружающего клуба воздуха.

Моделирование по первому варианту проводили с изменением мощности первого (центрального) нагревателя от 0 до 5 Вт с шагом 1 Вт; второго нагревателя — от 0 до 10 Вт с шагом 2 Вт (второй нагреватель состоял из двух боковых). Первоначально сравнивали изображения температурных полей в улье с нагревателями и без них (рис. 2). При этом выделяемая тепловая мощность центрального нагревателя равна 5 Вт, а суммарная тепловая мощность двух боковых нагревателей — 10 Вт. Из рис. 2 видно, что при включении нагревателей зоны с максимальной температурой в клубе смещаются в его нижнюю часть, что объяснимо с биологической точки зрения и соответствует действительности. Также видно, что в клуб теперь поступает теплый воздух.

Анализ изображений температур вдоль улья (рис. 3) показывает, что при включенных нагревателях внутри улья положительные температуры

занимают больший объем и, следовательно, у пчел появляется возможность перехода на новые кормовые запасы.

В результате моделирования установлено, что при максимальной мощности нагревателей (15 Вт) их удельная мощность составляет около 74000 Вт/м^3 ($Q_{el h}$) и пчелы сокращают выделение энергии с 3600 Вт/м^3 до 1900 Вт/м^3 (Q_{bee}), т. е. почти в два раза. Такое сокращение выделяемой мощности пчелами приведет и к сокращению потребления ими меда.

Исследования полученных результатов показывают, что если нет обогрева, то и пчелы выделяют энергию из расчета температуры окружающего клуба воздуха, т. е. близкой к значениям температуры вне улья. Таким образом, выделение тепловой энергии нагревателями дает возможность сократить выделение тепла пчелами. Естественно, это приведет к понижению потребления кормовых запасов пчелами и меньшему забиванию кишечника, что является существенным фактором выживаемости насекомых при длительной зиме.

После проведения нескольких итераций по изменению мощности нагревателей получены средние значения подводимой к ним мощности (табл. 1).

Начиная с температуры -15°C , мощность нагревателей принимали постоянной с точки зрения облегчения регулирования. При таких значениях выделяемой тепловой мощности внутри улья температура внутри клуба держится в диапазоне от $+24^{\circ}\text{C}$ до $+30^{\circ}\text{C}$ и на краях клуба температура находится на уровне $+12^{\circ}\text{C}$, что вполне допустимо. Однако отмечено, что при большом диа-

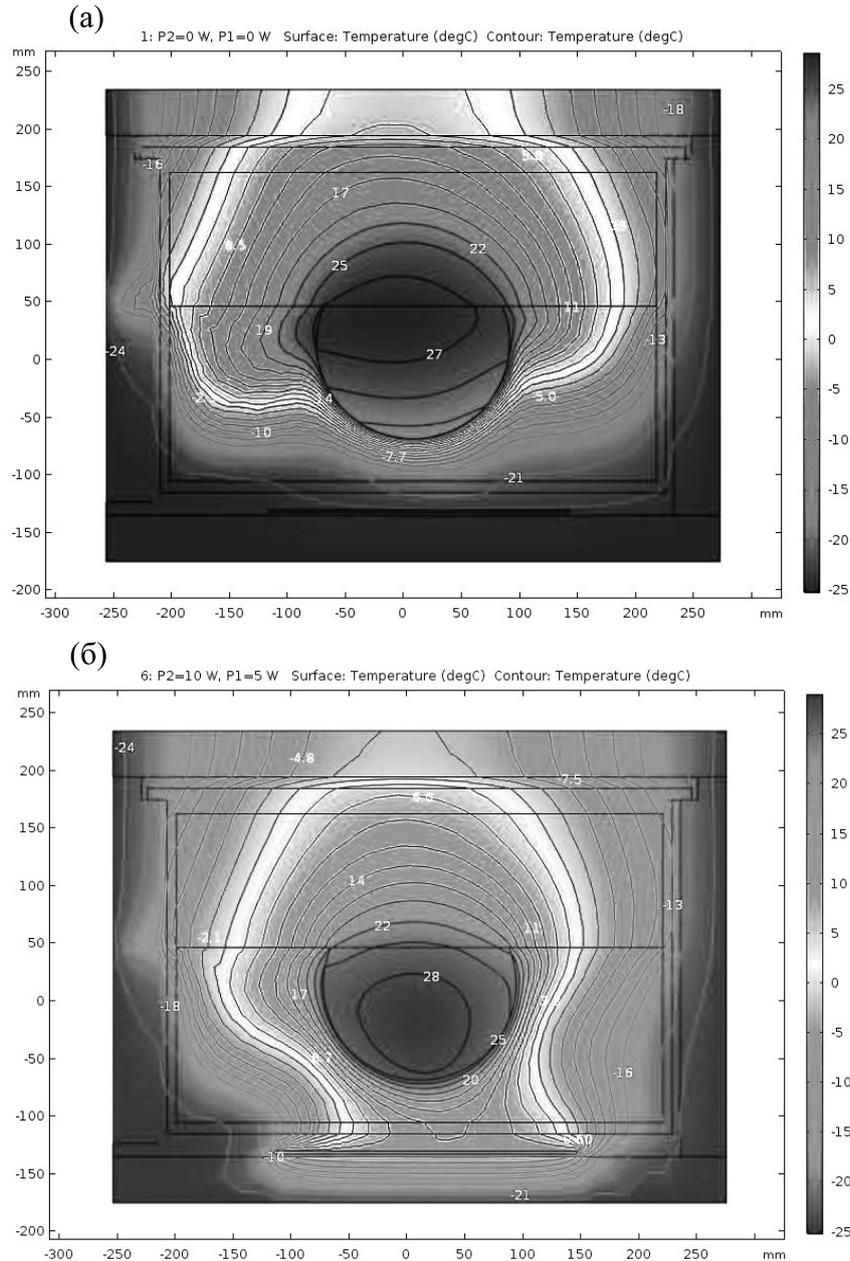


Рис. 2. Изображения температурных полей в разрезе клуба пчел: (а) – с выключенными нагревателями, (б) – с включенными нагревателями. P1 – значение выделяемой тепловой мощности центральным нагревателем, P2 – значение суммарной тепловой мощности, выделяемой двумя боковыми нагревателями.

пазоне изменения наружной температуры сохраняются также и колебания температуры внутри улья. Любые изменения наружной температуры беспокоят пчел, они начинают волноваться и пытаться подстроить свое поведение под ситуацию, проводить адекватные действия. Резкое повышение температуры приводит к провокации пчел на выход из улья, распаду зимнего клуба, что приводит к гибели большого количества особей, а

то и всей семьи. В случае понижения окружающей температуры пчелы начинают усиленно потреблять корм (что приводит к быстрому забиванию кишечника пчел) и сокращать площадь наружной поверхности клуба. Это, в свою очередь, может привести к тому, что часть пчел останется за пределами клуба, и они погибнут, или окажутся в месте, где осталось очень мало меда, и не смогут перейти к полномедным рамкам. Наилучший

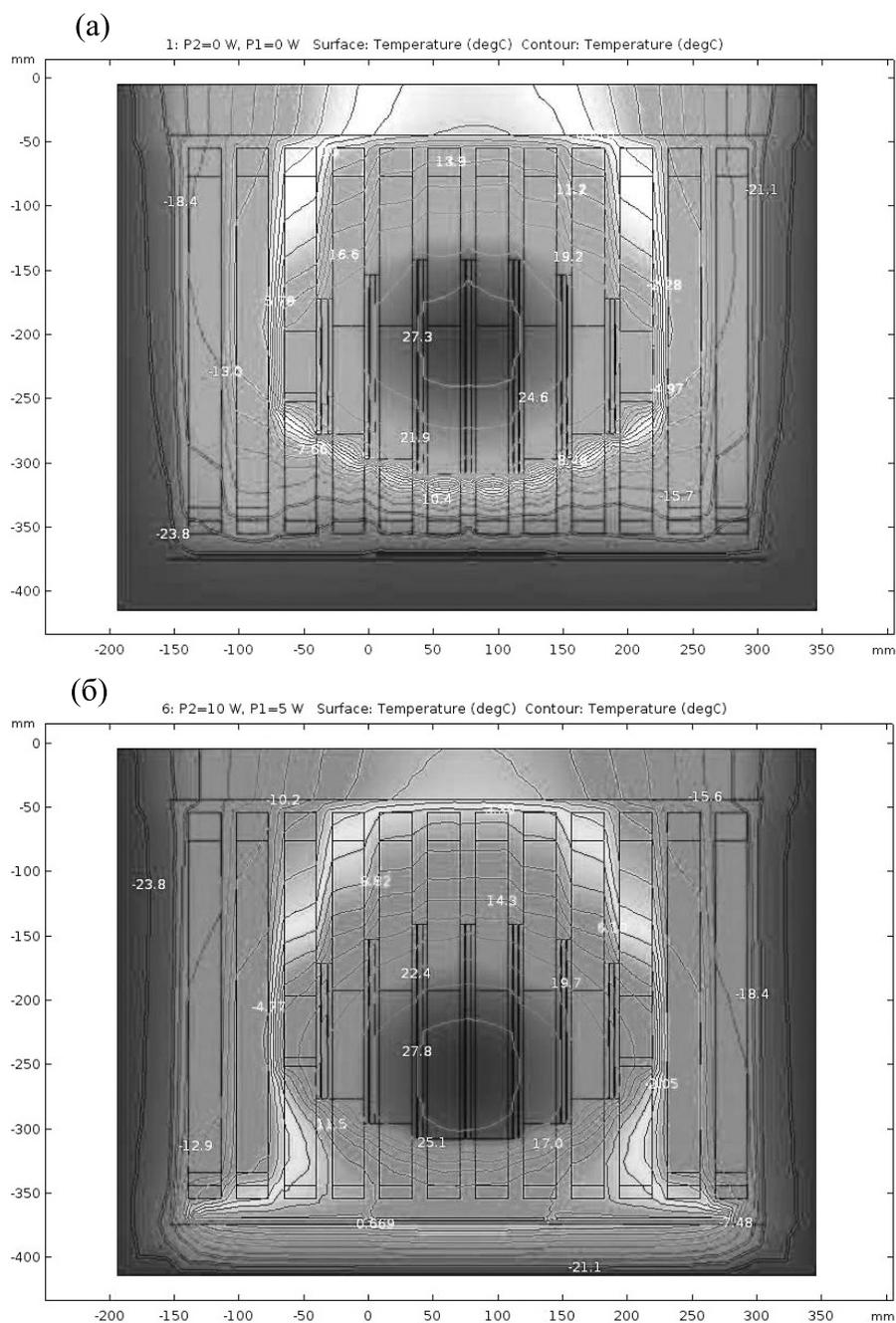


Рис. 3. Изображения температурных полей в разрезах через центр улья: (а) – при отключенных нагревателях, (б) – при включенном нагреве ($P_1 = 5$ Вт, $P_2 = 10$ Вт).

вариант — когда колебания температуры внутри улья будут минимальны, в пределах $2-3^{\circ}\text{C}$, тогда пчелы будут находиться в стабильном и спокойном состоянии. Таким образом, необходимо подобрать мощность нагревателей так, чтобы при довольно широком интервале изменения температуры окружающего воздуха внутри улья (вокруг

клуба) температура воздуха изменялась бы в максимально узком диапазоне или вообще была бы постоянной.

Следующим этапом моделирования была оптимизация подводимой мощности нагревателей. В результате нескольких итераций было определено оптимальное значение мощностей нагрева-

Таблица 1. Значения мощностей нагревателей при разных температурах окружающего воздуха (T_{out})

Наименование показателей	Значения показателей						
Температура, °C	0	-5	-10	-15	-20	-25	-30
Мощность нагревателя P1, Вт	3	4	4	5	5	5	5
Мощность нагревателей P2, Вт	6	8	8	10	10	10	10

Таблица 2. Значения оптимальных мощностей нагревателей при разных температурах окружающего воздуха (T_{out})

Наименование показателей	Значения показателей						
Температура, °C	0	-5	-10	-15	-20	-25	-30
Мощность нагревателя P1, Вт	1.6	3.6	5.9	8	9.5	10.5	11.5
Мощность нагревателей P2, Вт	3.26	7.2	11.8	16	19	21	23

телей по критериям минимального изменения температуры, контролируемой пчелами, и недопустимости перегрева нагревателей (табл. 2).

На рис. 4 представлены зависимости мощностей тепла, создаваемые пчелами и нагревателями, а также температурные графики нагревателя

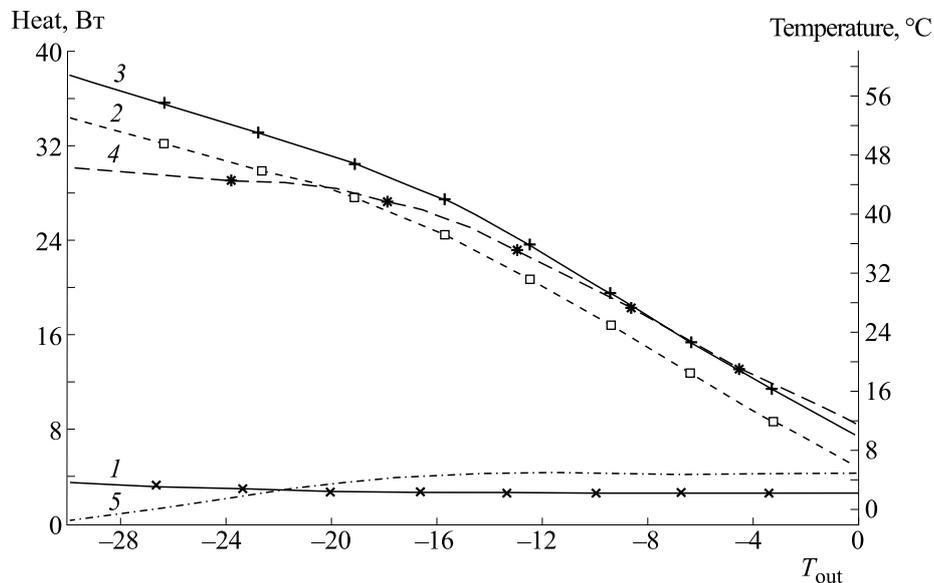


Рис. 4. Графики зависимости тепловых мощностей (Heat), выделяемых пчелами и нагревателями, от наружной температуры (T_{out}); зависимости температуры (Temperature) поверхностей нагревателей и температуры рамок, контролируемой пчелами, от наружной температуры (T_{out} , правая ось): 1 – максимальная тепловая мощность, генерируемая пчелами в клубе; 2 – максимальная тепловая мощность, выделяемая нагревателями; 3 – минимальная тепловая мощность, выделяемая пчелами в клубе и нагревателями; 4 – средняя температура поверхности нагревателя; 5 – средняя температура поверхности нижней части рамок, контролируемая пчелами).

Таблица 3. Средние значения температуры за двое суток в зимние месяцы 2016/2017 г.

Месяцы	Среднее значение температуры за очередные двое суток, °С															
Декабрь	-1	0	-7	-6	-4	-1	0	-10	-16	-14	-6	-6	-7	-8	-7	-6
Январь	-2	0	1	1	-1	2	-1	2	0	-3	-6	-4	-2	-12	-9	-15
Февраль	-14	-6	1	2	-3	-6	-7	-4	-11	0	2	1	8	-1	3	-

и поверхности, контролируемой пчелами. В качестве такой поверхности приняты плоскости нижних планок рамок, так как они имеют температуру, равную температуре воздуха, окружающего нижнюю часть клуба. В зависимости от этой температуры T_0 пчелы изменяют геометрию клуба и величину вырабатываемой тепловой энергии. Анализ полученных зависимостей показывает, что температура нагревателей не превышает +46°С, что допустимо, при этом температура, контролируемая пчелами, изменяется с +5°С до -1.5°С (начиная с температуры окружающего воздуха -20°С), такие внутренние колебания тем-

пературы уже можно принимать для практического использования.

ОБСУЖДЕНИЕ

Используя полученную модель с оптимальными значениями мощности нагревателей, можно произвести расчеты по расходу энергии пчелами и электронагревателями в определенные периоды зимовки. Для этого, используя метеоданные зимы 2016/2017 года, были получены таблицы со значениями температуры по трем зимним месяцам (табл. 3). Температуру брали как среднее значение за двое суток. Это связано с тем, что теплоемкость ульев довольно высокая, и постоянная времени находится на уровне 16 ч.

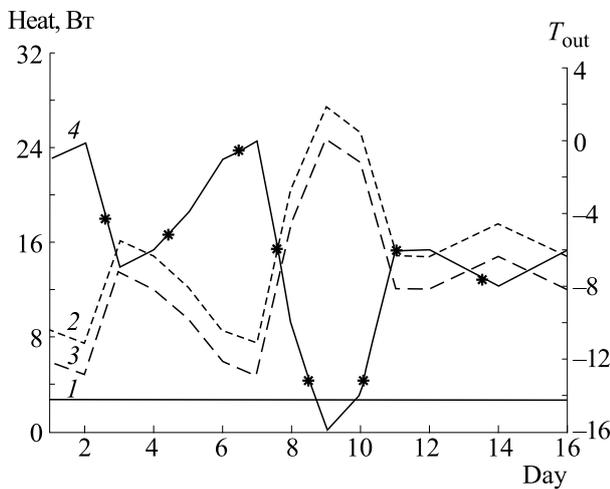


Рис. 5. Графики зависимости мощностей тепла (Heat), выделяемых пчелами и нагревателями, от дней декабря (Day) и наружная температура воздуха в этот период (T_{out} , правая ось): 1 — максимальная тепловая мощность, генерируемая пчелами в клубе; 2 — максимальная тепловая мощность, выделяемая пчелами в клубе и нагревателями; 3 — максимальная тепловая мощность, выделяемая нагревателями; 4 — T_{out} — наружная температура воздуха.

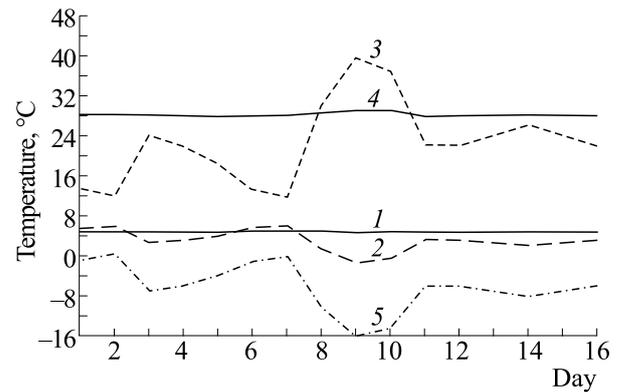


Рис. 6. Графики зависимости температуры в различных местах улья в течение первой половины декабря и наружной температуры в этот период: 1 — средняя температура поверхности нижней части рамок, контролируемая пчелами; 2 — средняя температура воздуха внутри улья; 3 — средняя температура поверхности нагревателя; 4 — максимальная температура в центральном сегменте клуба; 5 — T_{out} — наружная температура воздуха.

Подставив эти данные в модель как T_{out} , определяли соответствующие расходы электроэнергии для нагревателей и расходы энергии пчелами. Результаты моделирования в виде графиков зависимости соответствующих мощностей от календарных дней декабря месяца представлены на рис. 5 и 6.

Анализ рис. 6 показывает, что максимальная температура в центральном сегменте не превышает $+28^{\circ}\text{C}$, а температура воздуха внутри улья колеблется в незначительных пределах – от -2°C до $+5^{\circ}\text{C}$.

Также можно проводить определение массы съеденного меда из расчета, что для выделения пчелами тепловой мощности 1 Вт им нужен расход кормового меда 0.32 г/ч (г/Вт·ч). Тогда в декабре за счет электроподогрева пчелы сократят потребление корма на 388 г. Аналогичные данные получены также по другим зимним месяцам. Так, сокращение потребления меда за январь составит 242 г, а за февраль – 210 г. Всего за три зимних месяца экономия корма составит 840 г при дополнительном расходе электроэнергии 22.1 кВт·ч. Если учесть потребность в расходе корма и в осенние месяцы, то экономия меда достигнет 1 кг.

ВЫВОДЫ

Моделирование параметров микроклимата при включенных нагревателях в нижней части улья показало, что происходит смещение максимальных температур внутри клуба в нижнюю часть, но при этом внутренняя температура не превышает значение $+31^{\circ}\text{C}$. Включение нагревателей приводит к увеличению объема положительных температур, а значит, у пчел появляется возможность перехода на новые кормовые запасы. Установлено, что при удельной мощности нагревателей 74000 Вт/м^3 пчелы сокращают выделение энергии с 3600 Вт/м^3 до 1900 Вт/м^3 , что даст возможность пчеловодам оставлять меньше меда на зиму. Проведенная оптимизация мощностей нагревателей в среде Comsol по критерию минимума колебаний температуры внутри улья и ограничений температуры поверхностей нагревательных элементов показала, что при изменении температуры окружающей среды от 0°C до -30°C общая мощность нагревателей должна изменяться от 4.8 Вт до 34.5 Вт, при этом температура их поверхности не превышает 45°C , а температура вокруг клуба пчел изменяется от $+5^{\circ}\text{C}$ до -1.5°C . Подстановка оптимальных значений мощности нагревателей и метеоданных по зиме 2016/2017

года в полученную модель показала, что пчелы в течение всего периода выделяли мощность на уровне 2.7 Вт, а мощность нагревателей достигала в максимуме 24 Вт. На основе проведенных исследований была разработана система адаптивного электрообогрева пчел, на которую получен патент [15].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. E. Southwick and J. N. Mugaas, *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology* **40**, 935 (1971).
2. C. D. Owens, *The thermology of wintering honey bee colonies* (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Technical Bulletin no. 1429, 1971).
3. А. И. Касьянов, *Пчеловодство*, № 2, 16 (2003).
4. А. Д. Трифионов, *Пчеловодство*, № 11, 21 (1990).
5. А. Ф. Рыбочкин и И. С. Захаров, *Компьютерные системы в пчеловодстве* (Курский гос. техн. ун-т, Курск, 2004).
6. E. E. Southwick, *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiology* **75**, 641 (1983).
7. W. G. Meikle and N. Holst, *Apidologie* **46** (1), 10 (2015).
8. T. I. Szabo, *Am. Bee J. (USA)* **129**, 554 (1990).
9. Е. К. Еськов, В. А. Тобоев, *Зоол. Журнал* **90** (3), 335 (2011).
10. Е. К. Еськов и В. А. Тобоев, *Биофизика* **54** (1), 114 (2009).
11. В. А. Тобоев и М. С. Толстов, Межотраслевой институт «Наука и образование». Ежемесячный науч. журн., № 3, 116 (2014).
12. С. В. Оськин и Д. А. Овсянников, *Биофизика* **64** (1), 153 (2019).
13. С. В. Оськин и Д. А. Овсянников, *Электротехнологические способы и оборудование для повышения производительности труда в медотоварном пчеловодстве Северного Кавказа* (ООО «Крон», Краснодар, 2015).
14. D. W. Severson and E. H. Erickson, Jr., *Apidologie* **21**, 135 (1990).
15. Н. И. Богатырев, С. В. Оськин, Л. В. Потапенко и Е. В. Пустовойтова. Патент РФ №2639324, БИ, № 36 (2017).

Modeling of Thermophysical Processes in Electrically Heated Hives

S.V. Oskin and D.A. Ovsyannikov

Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, ul. Kalinina 13, Krasnodar, 350044 Russia

To help bee colonies survive the cold snaps and minimize honey consumption by a cluster of bees, the electric heat comes in useful to keep the bees warm. However, limited knowledge of behavioral patterns that create the bees when grouped in the winter cluster may sometimes cause the colony's demise or make the bees to consume larger volume of honey. This paper presents the results of modeling the physical processes within the hive environment using Comsol software version 5.3. The simulation was carried out at a fixed outdoor temperature with variable heater power as well as at fixed heater power and variable ambient temperature. Analysis of thermograms indicated that when the heating device operates, a transition from the warmest layer to the cold region in the winter cluster occurred, it can be explained by biological mechanisms. Also, it was shown that when the heating devices warm a hive, the warm air within a hive increases, consequently, offering a greater opportunity for bees to have new diets: this is especially important in spring. Simulation results demonstrate that at low temperatures bees reduce mechanical power output from 3600 W/m³ to 1900 W/m³ that is almost two times less. Such reduction in the mechanical power output of bees results in lesser amount of honey consumption. Simulation-based optimization of the input power to the heaters was also implemented following the criteria of minimum temperature fluctuations within the hive preventing the heaters from overheating.

Keywords: bee, hive, temperature, simulation, electric heating

ОПРАВДАЛСЯ ЛИ ДОЛГОСРОЧНЫЙ ПРОГНОЗ РИСКА ВЫМИРАНИЯ АЗОВСКОГО СУДАКА?

© 2020 г. Ю.В. Тютюнов*, **, И.Н. Сенина***, Л.И. Титова**, Л.В. Дашкевич*

*Федеральный исследовательский центр «Южный научный центр Российской академии наук», 344006, Ростов-на-Дону, просп. Чехова, 41

**Южный федеральный университет, 344090, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 200/1

***Collecte Localisation Satellites, rue Hermes 8-10, Ramonville Saint-Agne, 31520 France

E-mail: yuri.tyutyunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.08.2019 г.

После доработки 19.11.2019 г.

Принята к публикации 24.12.2019 г.

В конце 1990-х годов на основе стохастических экспериментов, проведенных с моделью долгосрочного прогноза популяционной динамики азовского судака, идентифицированной по данным наблюдений 1950–1981 гг. за запасом, выловами, температурой и соленостью Азовского моря, был сделан вывод о высокой вероятности квазивымирания популяции азовского судака в течение 35 лет, с 1982 по 2016 гг., обусловленного повышением солености моря. Данный вероятностный прогноз подтвердился — событие риска произошло в 2000-х годах: с 2005 г. численность взрослых особей судака не превышала 4 млн штук, а с 2017 г. введен полный запрет на вылов этого вида. Валидация результатов работы модели, проведенная в настоящее время, выявила достаточно хорошее (качественное и количественное) соответствие модельной траектории данным наблюдений за 1982–2018 гг. При этом обнаружено, что в современный период негативное воздействие, оказываемое на динамику численности стада повышением среднегодовых значений температуры моря, является не менее значительным, чем влияние роста солености. В соответствии с краткосрочным модельным прогнозом на 2019–2020 гг., в сложившихся условиях значительных положительных аномалий температуры и солености, введенный в 2017 г. запрет промысла не позволяет остановить снижение запаса азовского судака в ближайшие годы.

Ключевые слова: Азовское море, популяционная динамика, *Sander lucioperca* L., стохастическая модель, метод Монте-Карло, риск квазивымирания.

DOI: 10.31857/S0006302920020234

В конце 1990-х годов нами была построена имитационная модель динамики эксплуатируемой рыбной популяции, использованная для проведения стохастических экспериментов в целях долгосрочного прогноза изменений численности и оценки риска квазивымирания популяции азовского судака (*Sander lucioperca* L.) [1, 2]. Выбор судака в качестве модельного объекта обуславливался тем, что это один из ценных видов, запасы и уловы которого значительно снизились после зарегулирования в 1950-х годах Дона, крупнейшей реки бассейна Азовского моря. Наблюдающееся с 1960-х годов падение численности популяции судака является типичным последствием широкомасштабного антропогенного преобразования экосистемы Азовского моря — сходные проблемы имеют место и для других аборигенных полупроходных видов. Дальнейшее ухудшение условий воспроизводства полупроходных рыб произошло после зарегулирования

Кубани в 1972 г. Уменьшение пресного стока, увеличение затока (объема) черноморских вод и рост солености Азовского моря привели к существенному сокращению нерестовых и нагульных ареалов судака, леща, тарани, рыбца, чехони [3, 4].

Модель имела достаточно простую структуру и работала с годовым шагом по времени, описывая влияние на воспроизводство стада таких факторов среды, как температура и соленость Азовского моря. Основной задачей данного исследования являлось обоснование возможных ограничений промыслового изъятия, потенциально способных предотвратить чрезмерное падение запасов азовского судака, обусловленное продолжающимся осолонением моря. Кроме того, ихтиологов интересовал вопрос, насколько опасным для популяции является непреднамеренный прилов годовиков, обусловленный недостаточной селективностью сетей. Параметры модели были

идентифицированы с использованием представленных Азовским НИИ рыбного хозяйства данных, образующих временные ряды, характеризующие динамику моделируемой экологической системы с 1950 по 1981 гг. (т. е. 32 осредненные по годовому периоду записи). Ряды включали оценки численностей сеголеток, годовиков и взрослых особей судака, среднегодовые показатели солёности и температуры Азовского моря. С идентифицированной моделью проводили имитационные эксперименты по методу Монте-Карло, в которых для сгенерированных случайных значений температуры и солёности моря был рассчитан прогноз динамики численностей возрастных групп судака на 35 лет вперед, т. е. с 1982 по 2016 гг. Пучки траекторий, полученные таким образом для различных стратегий промыслового изъятия, использовались для оценки ожидаемых уловов, размеров стада, а также вероятностей события квазивымирания (*quasi-extinction*) популяции [5, 6]. На основе проведенных экспериментов с критическим уровнем квазивымирания, равным 4.8 млн взрослых особей, что соответствует 10% от максимального значения в ряду ихтиологических оценок запаса, нами был сделан достаточно пессимистично звучащий вывод о высокой вероятности коллапса популяции азовского судака в течение 35 лет, с 1982 по 2016 гг. [1, 2]. А именно, согласно модельным расчетам, даже при гипотетическом прекращении промысла риск квазивымирания популяции превышал 70%. При ежегодном промысловом изъятии третьей части взрослых особей прогнозируемый риск квазивымирания азовского судака составлял 86%.

Целью настоящей работы является ретроспективная валидация корректности данного вероятностного прогноза долгосрочной динамики популяции судака Азовского моря с использованием данных наблюдений за 1982–2018 гг. Статья организована следующим образом. Вначале дано краткое описание математической модели и использованных для ее идентификации исходных данных, представлены значения идентифицированных параметров, а также ранее полученные на основе этой модели результаты стохастических экспериментов. Затем приведены и обсуждены результаты валидации модели по данным наблюдений за запасами популяции судака и значениями учитываемых в модели абиотических факторов. В частности, показано, что падение численности популяции азовского судака, имевшее место в начале 2000-х годов, не может быть объяснено осолонением Азовского моря. Проверка гипотезы о критическом влиянии на воспроизводство судака климатических изменений (роста среднегодовой температуры моря) потребовала проведения дополнительных имитационных экспериментов с моделью. В заключительной части статьи обсуждаются достоинства и недостатки

использованного подхода, а также предлагается минимальная версия математической модели, корректно отражающая влияние внешних факторов на воспроизводство и выживаемость азовского судака и наилучшим образом объясняющая вариации численности стада.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ И РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОГНОЗА

Модель представляет собой систему разностных уравнений, описывающую динамику трех возрастных групп: сеголеток (N_0^t , годовиков N_1^t и взрослых особей, достигших возраста в два года и старше (N_2^t с годовым шагом $t = 0, 1, 2, \dots$:

$$N_0^{t+1} = (a_1 N_1^t + a_2 N_2^t) e^{-b(N_1^t + N_2^t)} e^{-\left(\frac{S^{t+1} - S_0}{\sigma_S}\right)^2} e^{-\left(\frac{T^{t+1} - T_0}{\sigma_T}\right)^2}, \quad (1)$$

$$N_1^{t+1} = p_0 N_0^t (1 - h_1^{t+1}), \quad (2)$$

$$N_2^{t+1} = (p_1 N_1^t + p_2 N_2^t) (1 - h_2^{t+1}), \quad (3)$$

где p_i – доля выживших в течение временного шага особей i -й возрастной группы ($t = 0, 1, 2$), а h_i^{t+1} – доля вылавливаемых в течение временного шага ($t, t + 1$) особей каждой возрастной группы. Выжившие в течение года сеголетки переходят в возрастную класс годовиков, а выжившие годовики пополняют класс взрослых особей популяции. Суммарный улов, полученный в течение года t , вычисляется как

$$C^t = w_1 h_1^t p_0 N_0^{t-1} + w_2 h_2^t (p_1 N_1^{t-1} + p_2 N_2^{t-1}),$$

где w_1 и w_2 – средние индивидуальные веса годовика и взрослой особи судака соответственно.

Как видно из уравнения (1), воспроизводство описывается модифицированной функцией Риккера [7]. Параметры a_1 и a_2 – соответственно коэффициенты плодовитости годовиков и взрослых особей; b – коэффициент внутривидовой конкуренции. В соответствии с законом толерантности Шелфорда [8–10] влияние на выживаемость мальков случайных факторов среды – среднегодовых значений солёности и температуры моря – учтено в уравнении (1) в виде множителей, имеющих вид функции распределения Гаусса, где S_0 и T_0 – оптимальные значения факторов, а σ_S и σ_T характеризуют толерантность вида к флуктуациям соответствующих характеристик среды [1]. Этот подход был нами ранее успешно использован при моделировании воспроизводства конкурирующих пелагических видов – азовской тюльки и азово-черноморской хамсы [11].

Идентифицированные параметры. Простота структуры и небольшое количество параметров

Таблица 1. Идентифицированные значения параметров модели (1)–(3)

Параметр	Регрессионные оценки	Результаты бутстрэппинга, $m \pm \sigma$
Плодовитость годовиков (a_1)	6.82	6.99 ± 4.53
Плодовитость взрослых (a_2)	12.67	14.35 ± 4.99
Внутривидовая конкуренция (b)	0.039	0.041 ± 0.01
Выживаемость сеголеток (p_0)	0.54	0.48 ± 0.08
Выживаемость годовиков (p_1)	0.47	0.52 ± 0.09
Выживаемость взрослых (p_2)	0.62	
Толерантность к солености (σ_S)	1.26	1.27 ± 0.19
Толерантность к температуре (σ_T)	1.92	1.91 ± 0.27
Оптимальная соленость (S_0)	11.0	
Оптимальная температура (T_0)	10.0	

обеспечили приемлемую точность идентификации модели на основе имевшихся на момент ее создания данных наблюдений за период 1950–1981 гг. (начальный год $t = 0$ в расчетах соответствовал 1949 г.). На этапе идентификации использовали численности возрастных групп, величины уловов, а также среднегодовые значения определяющих успех воспроизводства судака внешних факторов – солености и температуры моря. Коэффициент выживаемости взрослых особей p_2 и оптимальные значения внешних факторов S_0 и T_0 (обеспечивающие наилучшие условия для воспроизводства) взяты из ихтиологических исследований [12–14]. Остальные параметры модели были идентифицированы путем приближения модельной траектории к наблюдаемым значениям численностей возрастных групп (табл. 1). Ошибки полученных значений модельных параметров были оценены с использованием процедуры бутстрэппинга (*residual bootstrap*), описанной в работе [15]. Детали идентификации представлены в работе [2].

Стохастические имитационные эксперименты.

На следующем этапе идентифицированная модель была использована для проведения серии стохастических имитационных экспериментов по методу Монте-Карло на 35-летний период (с 1982 по 2016 гг.). Случайные значения временных рядов солености моря для этих экспериментов вычислялись на основе имитационного алгоритма, предложенного в работах [16, 17]. Входные ряды температурных данных генерировались методом рандомизации значений температуры моря, которые наблюдались в течение 1950–1981 гг. С этими случайными факторами и для различных комбинаций параметров h_i , характеризующих годовое промысловое изъятие годовиков и взрослых особей судака, были рассчитаны пучки 50-ти

независимых стохастических траекторий модельного прогноза на указанный период.

Затем результаты имитационных вычислений анализировали статистическими методами и интерпретировали в контексте задачи оптимизации экономического и экологического критериев: максимизации среднегодовых уловов и минимизации риска чрезмерного падения запаса судака – квазивымирания [5]. Критический порог квазивымирания популяции был принят равным 4.8 млн взрослых особей, что соответствует 10% от максимального значения в ряду ихтиологических оценок запаса. Оказалось, что ограничение промысла в модели не позволяет существенно снизить риск квазивымирания азовского судака [1, 2]. В соответствии с изоплетной диаграммой, приведенной на рис. 1, если при изъятии третьей части взрослых особей их численность в течение 35 лет снижается ниже критического уровня с вероятностью 86%, то полный запрет вылова уменьшает данный показатель риска лишь до 70%. При этом непреднамеренный прилов годовиков оказался не так опасен для популяции, как чрезмерный вылов взрослых особей. Причиной прогнозируемого коллапса популяции в имитационных расчетах являлось увеличение солености моря, предсказываемое статистической регрессионной моделью Бронфмана и Суркова [16], которую использовали для генерации рядов случайных значений $\{S^t\}$ в экспериментах Монте-Карло.

Сегодня можно констатировать, что данный нами вероятностный прогноз, к сожалению, оправдался – событие риска произошло в середине 2000-х годов, с 2005 г. оценка численности взрослых особей судака не превышала 4 млн штук [18]. Более того, запрет промысла азовского судака, который в конце 1990-х годов рассматривался лишь как гипотетический сценарий имитационного эксперимента, сегодня также стал реально-

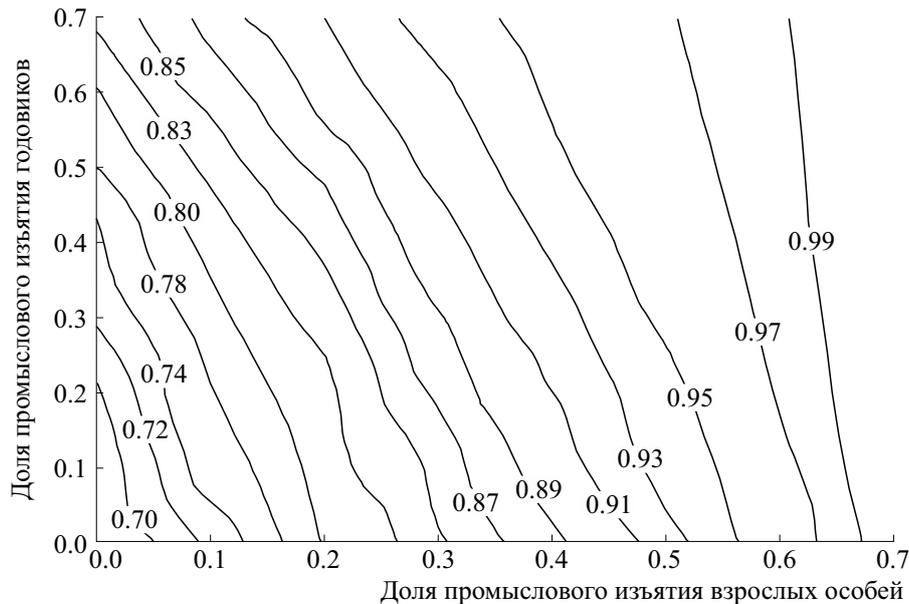


Рис. 1. Изоплетная диаграмма риска квазивымирания популяции (вероятности падения численности взрослых особей ниже заданного критического уровня) с 1982 по 2016 гг. как функции коэффициентов промышленного изъятия годовиков и взрослых.

стью — с 2017 года правилами рыболовства для Азово-Черноморского рыбохозяйственного бассейна введен полный запрет вылова этого вида [19, 20]. Изъятие азовского судака допускается только для целей воспроизводства и/или научно-исследовательских работ по заявкам воспроизводственных и научных организаций. Аналогичный запрет введен для берша и чехони [19, 20].

Заметим, что модель использовали не для расчета одной единственной траектории, которая едва ли была полезной для долгосрочного прогноза популяционной динамики, определяемой внешними факторами, имеющими существенную случайную составляющую. Целью исследования был именно вероятностный прогноз: при различных промышленных нагрузках, на основе достаточно большого количества стохастических экспериментов с идентифицированной моделью оценивали риски такого нежелательного события, как падение численности взрослых особей судака ниже установленного критического уровня квазивымирания.

Валидация модели и краткосрочный прогноз.

Спустя двадцать лет после проведения описанных выше имитационных экспериментов у нас появилась возможность валидации работы модели (1)–(3) с ранее идентифицированными параметрами путем расчета динамики численности возрастных групп азовского судака для фактических (а не разыгрываемых моделью) значений внешних факторов в период с 1982 по 2018 гг. и сопоставления данного модельного прогноза с обновленными данными о многолетней динамике

популяционных запасов азовского судака. Нами использованы материалы опубликованных результатов ихтиологических исследований [18, 21–30], а также Протоколов XIX–XXX сессий Российско-Украинской Комиссии (РУК) по вопросам рыболовства в Азовском море [19, 20, 31–36].

На вход модели (1)–(3) подавали временные ряды фактических среднегодовых значений солености и температуры Азовского моря с 1982 по 2018 гг. [37]. При этом среднюю годовую температуру воды для моря в целом рассчитывали согласно работе [38]. Наборы срочных данных наблюдений (температуры воды) гидрометеорологических станций были усреднены посуточно, помесечно и далее до среднегодовых значений. Среднегодовая соленость моря была рассчитана на основе данных экспедиционных наблюдений в открытом море и данных прибрежных гидрометеорологических станций согласно методике, подробно описанной в работе [39].

Поскольку для 2019–2020 гг. данных фактических измерений температуры воды и солености пока нет, для последних двух лет периода прогноза были использованы значения, полученные с помощью боксовой гидродинамической модели Бердникова [40], включающей модули расчета температурного и ледового режимов, балансовый модуль водного обмена и режима солености. Модельные значения солености на 2019 и 2020 гг. равны 11.78 и 11.71‰, а температуры — 12.61 и 12.55°C соответственно.

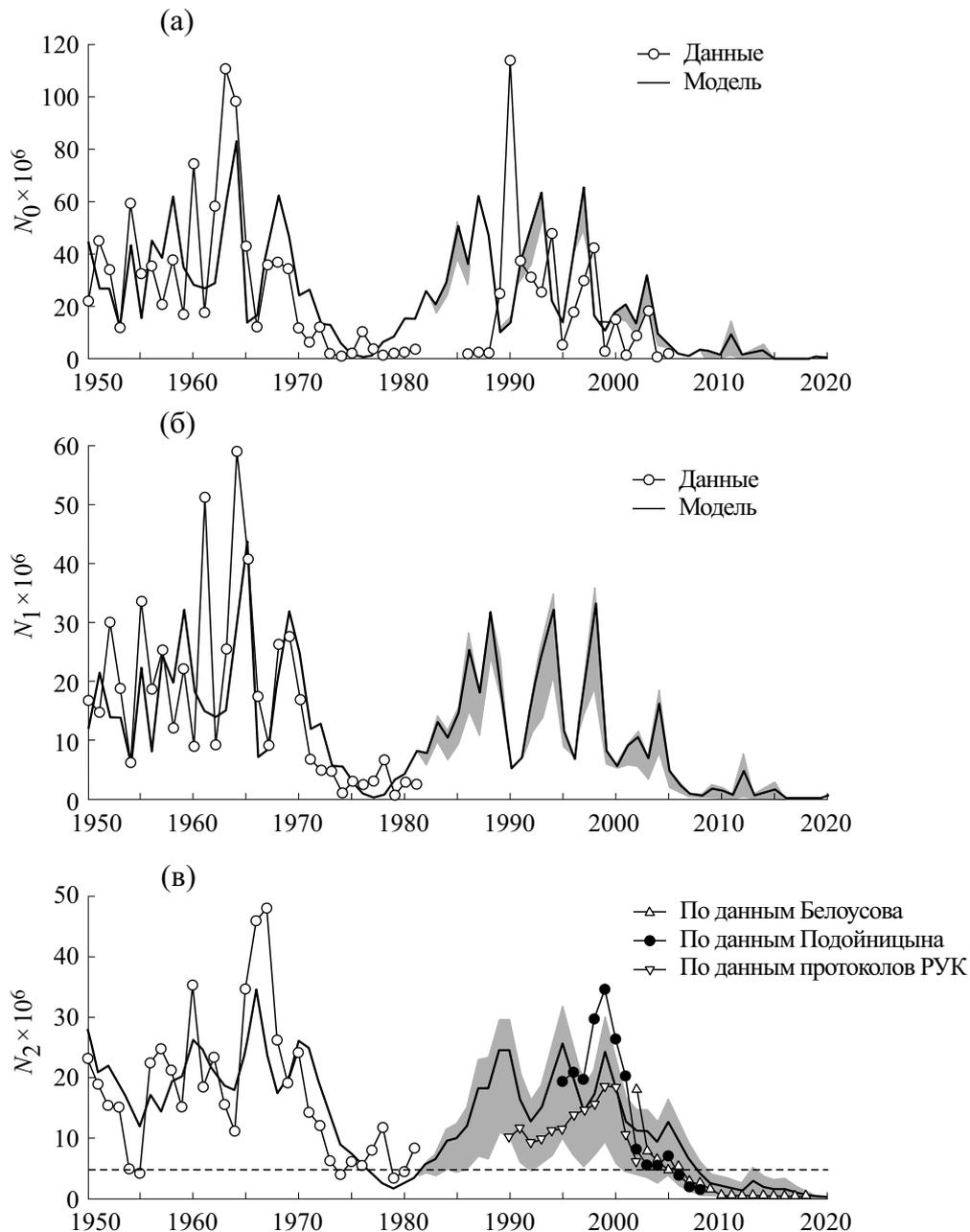


Рис. 2. Модельная и наблюдаемая динамика численности сеголетков (а), годовиков (б) и взрослых особей (в) азовского судака (млн шт.): 1950–1981 гг. — идентификация; с 1982 г. — валидация модели с коэффициентом изъятия $h = 0.07$ в 1982–2016 гг. и запретом промысла с 2017 г. Серым цветом показан разброс прогнозируемых численностей возрастных групп, соответствующий интервалу значений коэффициента промысла $0 \leq h \leq 0.3$. Пунктиром показан уровень квазивимирания.

На рис. 2 представлены результаты расчетов, при проведении которых предполагалось, что до введения запрета на промысел судака в 2017 г., с 1982 по 2016 гг. ежегодно вылавливается 7% годовиков и взрослых особей, что равно среднему значению коэффициента промыслового изъятия в 1950–1981 гг. Заметим, что значения коэффициента промыслового изъятия в указанные годы вычисляли на основе официальной статистики вы-

ловов. Однако фактический промысел мог быть значительно выше официального [18, 23, 24]. По мнению ихтиологов объем незаконного (соответственно, неучтенного) вылова азовского судака всегда был существенным и сопоставимым с легальным промыслом, а после распада СССР доля браконьерского изъятия значительно увеличилась [18, 23, 24, 28]. При идентификации модели неучтенная промысловая смертность автомати-

чески компенсировалась значениями других параметров, прежде всего значениями коэффициентов выживаемости p_i , что обеспечило хорошее приближение модельной траектории к использованным при идентификации модели оценкам численности возрастных групп судака (см. идентификационный участок траектории на рис. 2, соответствующий периоду с 1950 по 1981 гг.). При отсутствии достоверной статистики реального промысла в период валидации модели представляет интерес оценка чувствительности модели к вариациям параметра промыслового изъятия h . Для этого наряду с модельной траекторией, полученной при фиксированном коэффициенте изъятия $h = 0.07$, на рис. 2 представлены результаты дополнительных вычислительных экспериментов в виде коридора значений переменных модели при варьировании коэффициента изъятия в широких пределах ($h \in [0.0, 0.3]$).

Выполненные вычисления показывают достаточно хорошее соответствие модельных траекторий данным наблюдений в 1982–2018 гг. [18, 21–30, 41]. Наибольшее отклонение наблюдается в 1990 г. для численности сеголеток. Однако именно в этом году ихтиологами отмечалась аномально высокая выживаемость сеголеток азовского судака в летний период, которую они объясняли снижением количества тюльки, в свою очередь обусловленным вселением в Азовское море гребневика *Mnemiopsis leidyi* [21, 42]. В результате в июле 1990 г. выживших сеголеток судака оставалось больше 100 млн шт., что в четыре-пять раз превышало их количество в предыдущие годы. Однако уже в сентябре-октябре численность сеголеток упала до 10 млн шт. [21, 42], что вполне соответствует прогнозу нашей модели, которая не включает в себя описание межвидовых отношений и, работая с годовым шагом, не предназначена для предсказания подобных краткосрочных аномалий. Вот что пишет об этих наблюдениях Л.В. Кукарина: «Выживание сеголеток за период «лето–осень» в 1989–1994 гг. составляло 2–25% их численности в июле. Высокий процент гибели подрощенных сеголеток в сложившихся условиях был обусловлен развитием у судака внутривидовой пищевой конкуренции на акватории Таганрогского залива. Доля молоди собственного вида в питании увеличилась с 0.2–0.4% до 4–6% в начале 1990-х годов» [42].

Модельные расчеты корректно отображают намечившееся в период 1982–2000 гг. восстановление популяции судака, обусловленное наблюдавшимся в данный период опреснением Азовского моря, однако с начала 2000-х годов начинается новая фаза снижения численностей всех трех возрастных групп. Падение запасов в этот период на первый взгляд выглядит неожиданным, поскольку в эти годы соленость не являлась лимитирующим фактором для популяции судака [18]

(соленость моря резко повышается лишь после 2010 г., см. график на рис. 3).

Простота имитационной модели (1)–(3), которая учитывает минимальное количество внешних факторов, оказывающих влияние на популяционную динамику, позволяет предположить, что отмеченное снижение численности судака может быть вызвано изменениями температуры моря. Действительно, на графике среднегодовых значений температуры в 1983–2018 гг., изображенном на рис. 3, хорошо виден восходящий тренд, который, по-видимому, связан с глобальными климатическими изменениями. Аномально высокие температуры в таком мелком водоеме, как Азовское море, являются причиной возникновения зон гипоксии, частота образования которых увеличилась в последнее десятилетие, в том числе, в восточной части моря и Таганрогском заливе [43, 44]. Формирование зон с дефицитом кислорода оказывает как прямое воздействие на выживаемость судака, особенно его молоди, так и опосредованное, вследствие подрыва кормовой базы вида.

Дополнительные эксперименты и минимальная модель. Преимуществом модели (1)–(3) является возможность учета эффекта воздействия температуры моря на выживаемость сеголеток при помощи всего лишь двух параметров: оптимального значения температуры T_0 и характеристики толерантности вида к отклонениям от этого значения σ_T . Чтобы проверить гипотезу о влиянии роста температуры на снижение запасов судака, был проведен дополнительный имитационный эксперимент, в котором использовали очищенный от линейного тренда температурный ряд (показан серым цветом на рис. 3). При этом целесообразно зафиксировать промысловое изъятие, поэтому, как и в предыдущем эксперименте, с 1982 г. были использованы усредненные коэффициенты промыслового изъятия $h_1 = h_2 = 0.07$, а с 2017 г. вылов в модели не осуществлялся. Результаты вычислений представлены на рис. 4.

Как можно видеть, устранение растущего тренда в динамике среднегодовой температуры позволяет восстановить численность взрослых особей до уровня, превышающего критический порог квазивымирания популяции в течение всего валидационного периода с 1982 по 2018 гг. Вместе с тем, согласно расчетам, даже устранение негативного воздействия температурного фактора и прекращение вылова в 2017 г. не позволяет переломить обусловленную аномально высокими значениями солености моря тенденцию к падению запаса судака, наблюдающуюся в модели после небольшого прироста численности взрослых особей в 2013 г. Так, в 2019 и 2020 гг. модель без температурного тренда также предсказывает па-

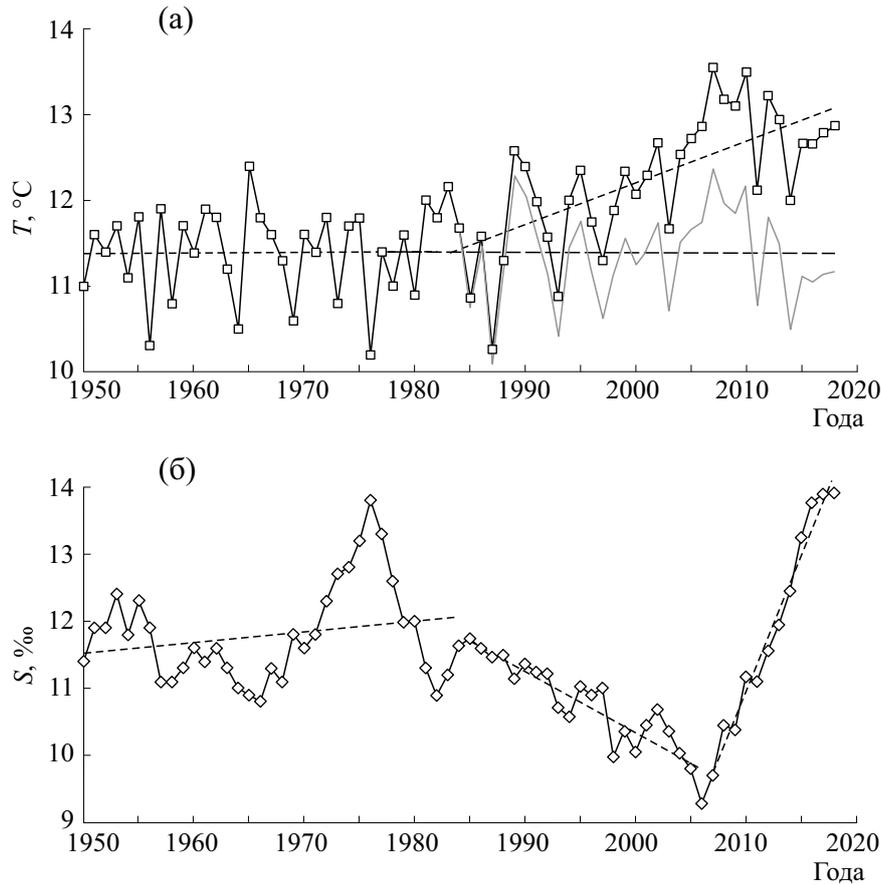


Рис. 3. Среднегодовые значения наблюдений температуры (а) и солености (б) Азовского моря в период 1950–2018 гг. Пунктирными линиями на графике температуры показаны многолетние тренды, соответствующие периодам 1950–1982 гг. ($y = 0.0007x + 11.38$) и 1983–2018 гг. ($y = 0.049x + 9.73$). Серым цветом показан ряд температур с нулевым трендом ($y = 11.38$). Для солености выделены три периода с диаметрально меняющимся трендом: 1950–1984 гг. ($y = 0.016x + 11.52$), 1985–2006 гг. ($y = -0.09x + 15$) и 2007–2018 гг. ($y = 0.4x - 13.7$).

дение численности половозрелого стада ниже порога квазивымирания, установленного при проведении стохастических экспериментов.

Еще одна гипотеза, которую мы проверили, связана со структурной устойчивостью модели (1)–(3) – свойством, характеризующим зависимость прогноза модели от изменения ее структуры. Нетрудно заметить (см. рис. 2), что временные ряды наблюдаемых значений сеголеток и годовиков обладают высокой степенью корреляции. Так, для смещенных на один год сеголеток N_0^{t+1} и годовиков N_1^t коэффициент корреляции $r = 0.96$. Фактически это означает, что использование данных по численности годовиков не добавляет информации о динамике популяции при минимизации целевой функции (суммы квадратов разностей натуральных и модельных значений численностей возрастных групп). Следовательно, использование этого временного ряда не только усложняет модель, но и снижает точность оценки параметров, контролирующих влияние переменной N_1^t на динамику системы (1)–

(3), то есть параметров a, b, p_0, h_0 . Данное обстоятельство, в частности, объясняет довольно большую ошибку, полученную методом бутстрэппинга для параметра a_1 (см. табл. 1). Следовательно, мы можем упростить модель (1)–(3), опуская уравнение (2) без ущерба качеству модели в предсказании динамики популяции судака. Модель (1)–(3) при этом трансформируется в следующую минимальную модель с двумя переменными, N_0^t – численность сеголеток и N_1^t – численность взрослых особей старше одного года соответственно:

$$N_0^{t+1} = aN_1^t e^{-bN_1^t} e^{-\left(\frac{S^{t+1}-S_0}{\sigma_S}\right)^2} e^{-\left(\frac{T^{t+1}-T_0}{\sigma_T}\right)^2}, \quad (4)$$

$$N_1^{t+1} = (p_0 N_0^t + p_1 N_1^t)(1 - h^{t+1}), \quad (5)$$

где a – плодовитость, b – внутривидовая конкуренция, p_1 – выживаемость взрослых особей и h – промысловое усилие на взрослое стадо. Остальные параметры те же, что и в модели (1)–(3).



Рис. 4. Динамика численности взрослых особей азовского судака, рассчитанная по модели (1)–(3) с рядом наблюдаемых и очищенных от восходящего тренда температур в сравнении с ихтиологическими оценками размера промыслового стада.

Как видно, по сравнению с системой (1)–(3) модель (4)–(5) включает меньше параметров, при этом все они могут быть довольно точно оценены в результате минимизации целевой функции (см. табл. 2). В частности, значение параметра p_2 было зафиксировано в модели (1)–(3), теперь для коэффициента выживаемости взрослых особей старше одного года получена оценка с ошибкой 28% (см. табл. 2 и соответствующее ему p_1 в модели (4)–(5)), оцененной методом бутстрэппинга, который подробно описан в работе [2].

Как и ожидалось, и полная, и минимальная модель дают практически одинаковые приближения временных рядов численностей сеголеток и взрослых рыб старше одного года: минимальные значения целевых функций, включающих в себя эти переменные, равны 16608 и 16618 соответственно. При этом модель (1)–(3) объясняет 50 и 66% вариаций данных по численности сеголеток и взрослых соответственно, минимальная модель (4)–(5) – 52 и 66% соответственно. Предсказания модели (4)–(5) согласуются с результатами модели (1)–(3) как в период минимизации ошибки модельных предсказаний, т.е. 1950–1981 гг., так и в период валидации в 1982–2018 гг.

(см. рис. 5). Как и для модели (1)–(3), для двух последних лет, соответствующих периоду краткосрочного прогноза на 2019 и 2020 гг., нами были использованы приведенные в предыдущем разделе значения солености и температуры, вычисленные с помощью внешней гидродинамической модели Бердникова [40].

Помимо результатов валидации и прогноза на 1982–2020 гг., рассчитанных по модели (4)–(5) со значением $h = 0.07$ (траектории черного цвета), на рис. 5 показан разброс прогнозируемых значений численностей возрастных групп азовского судака, соответствующий интервалу значений коэффициента промыслового изъятия $0 \leq h \leq 0.3$. Для сравнения и демонстрации структурной устойчивости модели тонкими линиями изображены траектории, соответствующие прогнозу полной модели (1)–(3). Также на рис. 5б показана динамика численности взрослых особей, рассчитанная по обеим моделям (4)–(5) и (1)–(3) (соответственно жирная и тонкая линии серого цвета) для очищенного от восходящего тренда ряда температур. Заметим, что увеличение суммарной численности годовиков и взрослых в 2020 г. в предполагаемом сценарии стабильного темпера-

Таблица 2. Идентифицированные значения параметров минимальной модели (4)–(5)

Параметр	Регрессионные оценки	Результаты бутстрэппинга, $m \pm \sigma$
Плодовитость (a)	9.49	10.79 ± 3.64
Внутривидовая конкуренция (b)	0.04	0.04 ± 0.009
Выживаемость сеголеток (p_0)	0.63	0.62 ± 0.14
Выживаемость взрослых (p_1)	0.49	0.48 ± 0.14
Толерантность к солености (σ_S)	1.27	1.22 ± 0.15
Толерантность к температуре (σ_T)	2.22	2.28 ± 0.35
Оптимальная соленость (S_0)	11.0	
Оптимальная температура (T_0)	10.0	

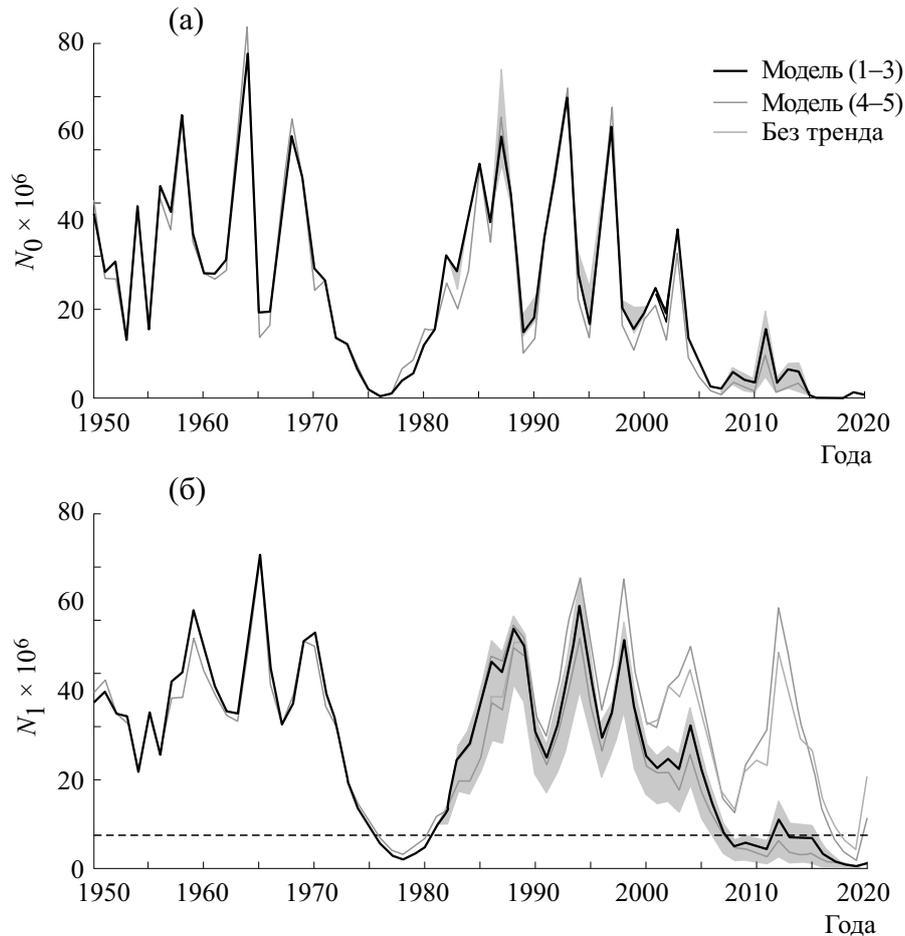


Рис. 5. Динамика численности сеголеток (а) и взрослых (б) особей судака Азовского моря в модельных экспериментах с коэффициентом изъятия $h = 0.07$ в 1982–2016 гг. и запретом промысла с 2017 г. На графике (б) дополнительно приведены траектории, рассчитанные с очищенным от восходящего тренда рядом температур. Серым цветом показан разброс прогнозируемых моделью (4-5) численностей возрастных групп, соответствующий интервалу значений коэффициента промысла $0 \leq h \leq 0.3$. На графике (б) дополнительно приведены траектории, рассчитанные по обеим моделям (1)–(3) и (4)–(5) с очищенным от восходящего тренда рядом температур.

турного режима обусловлено благоприятным для воспроизводства низким значением солености в краткосрочном прогнозе на 2019 г. (11.78‰), что наглядно демонстрирует высокую чувствительность судака к этому внешнему фактору. Пунктиром показан критический порог квазивымирания, составляющий 10% от максимальной численности взрослых особей в 1950–1981 гг., для модели (4)–(5) равный 7.5 млн шт. Так же как и полная модель (1)–(3), под влиянием наблюдаемых и прогнозных значений солености и температуры минимальная модель (4)–(5) предсказывает падение численности популяции судака значительно ниже критического уровня, при этом решающую роль в снижении запаса играет наблюдающийся с конца 1980-х годов рост среднегодовых температур Азовского моря.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты еще раз демонстрируют эффективность и применимость простых стохастических моделей для долгосрочного прогнозирования динамики промысловых рыбных популяций (см. также работы [2, 11, 45–51]).

Выполненное исследование позволяет сделать вывод о том, что причиной уменьшения запасов судака в последние десятилетия, наряду с ростом солености, может быть увеличение температуры моря. При этом эффект, в настоящее время оказываемый на динамику численности стада потеплением, может быть даже значительно сильнее влияния роста солености моря.

Интересно, что до конца XX века в круг проблем, имеющих отношение к возможному падению запаса судака в Азовском море, включались прежде всего негативные последствия зарегулирования пресного стока. Эти последствия рас-

смаивались в контексте антропогенных изменений экосистем Дона и Азовского моря, обусловленных строительством Цимлянского водохранилища [3, 4, 52, 53]. К ним, помимо осолонения моря и инвазии гребневика мнемнопсица (*Mnemiopsis leidyi*) [54], относились перекрытие путей миграций и сокращение естественных нерестовых ареалов проходных и полупроходных видов промысловых рыб [4, 24]. Не меньшее внимание уделялось неконтролируемому, в частности, браконьерскому промыслу судака, проблемам перелова [4, 23] и непреднамеренного вылова годовиков [2]. В настоящее время запрет промысла рассматривается в качестве меры, способной остановить падение запасов данного вида [19, 20]. Оценивая потенциал восстановления популяции при полном запрете промысла судака, авторы работы [27] пришли к выводу, что кормовая база в Азовском море не является лимитирующим фактором, способствующим сокращению его запасов. Однако ретроспективный анализ воздействия среднегодовой температуры на динамику популяции азовского судака меняет оценку эффективности запрета промысла и перспектив восстановления промыслового стада. В этой связи следует заметить, что хотя воздействие температуры моря на воспроизводство и выживаемость судака признавалось важным, что и обусловило необходимостью ее включения в модель (1)–(3), данный фактор не рассматривался специалистами–ихтиологами в качестве критического, способного подорвать популяцию. Тем не менее модель (1)–(3) смогла достаточно корректно отразить негативные последствия роста температуры Азовского моря, наблюдающегося с конца 1980-х годов.

Дополнительные эксперименты с минимальной моделью (4)–(5) показали, что предложенный подход к моделированию динамики популяции судака Азовского моря устойчив по отношению к структурным изменениям модели. Это говорит о том, что информация о динамике и падении численности заложена в использованных при идентификации модели данных за 1950–1981 гг. При этом очевидно, что влияние факторов внешней среды, в особенности температуры, на прогнозируемые падения численности судака до уровня квазивымирания является, несомненно, решающим. Несмотря на то что точное значение параметра промысловой нагрузки не может быть определено, модельные расчеты с варьируемым в широких пределах коэффициентом изъятия $h \in [0.0, 0.3]$ показывают, что потенциал восстановления популяции от введенного в 2017 г. запрета на промысел азовского судака невелик, тем более что вплоть до недавнего времени имела место высокая, не соответствующая уровню воспроизводства, интенсивность как официального, так и браконьерского промысла судака [4, 18, 23, 24, 41]. Ситуация ухудшается такой отмеченной

специалистами особенностью текущего состояния Азовского моря, как одновременные значительные положительные аномалии температуры и солености вод, которые ранее не наблюдались в истории изучения данного водоема [37].

Таким образом, мы можем сделать еще одно заключение на основании проведенного исследования. Оно заключается в том, что даже те «пессимистические» оценки риска квазивымирания судака, которые были получены нами двадцать лет назад [1, 2], следует считать заниженными. Это объясняется тем, что псевдослучайные значения среднегодовых температур, которые были использованы в имитационной модели (1)–(3) при проведении экспериментов Монте-Карло, генерировались на основе ранее наблюдаемых данных и потому не могли содержать экстремально высоких значений, характерных для сегодняшнего периода.

ВЫВОДЫ

Выполненное исследование позволяет сделать следующие общие выводы:

1) выявлено достаточно хорошее качественное и количественное соответствие прогноза модели реальной динамике численности возрастных групп азовского судака;

2) наблюдающееся с начала 2000-х годов устойчивое снижение полученных ихтиологами оценок численности популяции, которое явилось основанием введения полного запрета промысла азовского судака, подтверждает правильность сделанного двадцать лет назад долгосрочного вероятностного прогноза квазивымирания популяции;

3) в течение последнего десятилетия, помимо осолонения, негативное воздействие на воспроизводство судака оказывает наблюдаемый рост среднегодовой температуры Азовского моря;

4) модельные эксперименты показывают, что в сложившихся условиях значительных положительных аномалий температуры и солености, введенный в 2017 г. запрет промысла обладает ограниченным потенциалом восстановления запаса судака.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Публикация подготовлена в ходе реализации ГЗ ЮНЦ РАН, тема «Разработка методов геоинформационного моделирования морских и наземных экосистем», № государственной регистрации проекта 01201363188 (Тютюнов, Дашкевич); базовой части ГЗ ЮФУ, тема «Фундаментальные и прикладные задачи математического моделирования», № 1.5169.2017/8.9 (Титова); проекта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-01-00453а «Мультистабильные пространственно-

временные сценарии в популяционных системах» (Тютюнов).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. В. Тютюнов, И. Н. Сенина и Л. И. Титова, в кн. *Компьютерное моделирование. Экология: учебное пособие*, под ред. Г. А. Угольницкого (Вузовская книга, М., 2000), сс. 58–78.
2. Yu. Tyutyunov, I. Senina, C. Jost, and R. Arditi, *Ecol. Modelling* **149**, 297 (2002).
3. В. В. Дроздов, Ученые записки Российского государственного гидрометеорологического университета **15**, 155 (2010).
4. П. А. Балыкин, Д. Н. Куцын и А. М. Орлов, *Океанология* **59** (3), 396 (2019).
5. L. R. Ginzburg, L. B. Slobodkin, K. Jonson, and A. G. Bindman, *Risk Analysis* **2**, 171 (1982).
6. H. R. Akçakaya and L. R. Ginzburg, in *Species conservation: a population biological approach*, Ed. by A. Seitz and V. Loeschke (Birkhäuser Verlag, Basel, 1991), pp. 78–87.
7. W. E. Ricker, *J. Fish. Res. Board of Canada* **11**, 559 (1954).
8. V. E. Shelford, *Animal communities in temperate America: as illustrated in the Chicago region: a study in animal ecology (No. 5)* (University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 1913).
9. Э. Пианка, *Эволюционная экология* (Мир, М., 1981).
10. В. Г. Ильичев, *Устойчивость, адаптация и управление в экологических системах* (Физматлит, М., 2009).
11. I. Senina, Yu. Tyutyunov, R. Arditi, *J. Appl. Ecol.* **36**, 297 (1999).
12. Н. П. Гоптарев, А. И. Симонов, Б. М. Затучная и Д. Е. Гершанович, *Гидрометеорология и гидрохимия морей СССР. Т. 5. Азовское море* (Гидрометеоиздат, Санкт-Петербург, 1991).
13. А. М. Бронфман, С. П. Воловик, С. В. Козлитина и др., *Статистическая структура океанологических и биологических параметров экосистемы Азовского моря* (Изд-во Рост. ун-та, Ростов-на-Дону, 1979).
14. А. М. Бронфман, В. Г. Дубинина и Г. Д. Макарова, *Гидрологические и гидрохимические основы продуктивности Азовского моря* (Пищевая промышленность, М., 1979).
15. В. Efron and R. J. Tibshirani, *An introduction to the bootstrap* (Chapman and Hall, London, 1993).
16. А. М. Бронфман и Ф. А. Сурков, *Труды ВНИРО* **118**, 62 (1976).
17. Д. Я. Раткович, *Водные ресурсы*, № 1, 5 (1977).
18. Д. А. Подойницын, *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки*, № 4, 111 (2010).
19. *Протокол XXIX сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Ростов-на-Дону, 2018).
20. *Протокол XXX сессии Украинско-Российской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Ростов-на-Дону, 2019).
21. В. Н. Белоусов, в сб. *Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна (1998–1999 гг.)* (Изд-во БКИ, Ростов-на-Дону, 2000), сс. 88–96.
22. В. Н. Белоусов, в сб. *Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна (2000–2001 гг.)* (Вопросы рыболовства, М., 2002), сс. 279–291.
23. В. Н. Белоусов, в сб. *Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна (2002–2003 гг.)* (Медиа-Пресс, Ростов-на-Дону, 2004), сс. 131–137.
24. В. Н. Белоусов, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (КубГАУ, Краснодар, 2004).
25. Д. А. Подойницын, в сб. *Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна (2004–2005 гг.)* (Изд-во «Диапазон», Ростов-на-Дону, 2006), сс. 199–207.
26. Е. П. Цуникова, Т. М. Попова, Е. А. Порошина и Е. А. Нефедова, в сб. *Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна (2006–2007 гг.)* (Медиа-Пресс, Ростов-на-Дону, 2008), сс. 270–293.
27. В. А. Гетманенко, Е. П. Губанов и Л. В. Изергин, *Рибне господарство України: науково-виробничий журнал*, № 3, 4 (2012).
28. А. А. Живоглядов и С. В. Лукьянов, *Вопр. рыболовства* **19** (4), 405 (2018).
29. С. В. Лукьянов и А. А. Живоглядов, в сб. *Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2018* (Севастопольский гос. ун-т, Севастополь, 2018), сс. 739–743.
30. С. В. Лукьянов и А. А. Живоглядов, в сб. *Конфликт природопользования: роль в эволюции ноосферы* (Астраханский гос. ун-т, Астрахань, 2019), сс. 78–83.
31. *Протокол XIX сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Анапа, Россия, 2007). URL: <http://docs.cntd.ru/document/902114750>
32. *Протокол XX сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Бердянск, Украина, 2008). URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/2067519>
33. *Протокол XXI сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (пос. Рожок Ростовской области, Россия, 2009). URL: <http://bestpravo.com/rossijskoje/xd-pravila/b8b/index.htm>
34. *Протокол XXIII сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Темрюк, Краснодарский край, Россия, 2011). URL: <http://www.>

- fishindustry.net/governmental-bodies/2164-rezultaty-xxiii-sessii-rossiysko-ukrainskoj-komissii-po-voprosam-rybolovstva-v-azovskom-more.html
35. *Протокол XXIV сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Бердянск, Украина, 2012).
 36. *Протокол XXVIII сессии Российско-Украинской Комиссии по вопросам рыболовства в Азовском море* (Киев, Украина, 2016). URL: <http://azniir.kh.ru/novosti/xxviii-sessiya-rossiysko-ukrainskoj-komissii-po-voprosam-rybolovstva-v-azovskom-more-zavershila-svoyu-rabotu-v-kieve-ukraina/>
 37. Л. В. Дашкевич, С. В. Бердников и В. В. Кулыгин, Водные биоресурсы и среда обитания **2** (2), 7 (2019).
 38. Л. В. Дашкевич и В. В. Кулыгин, Материалы Международной конференции «ИнтерКарто. ИнтерГИС. Геоинформационное обеспечение устойчивого развития территорий» **25** (2), 112 (2019). <https://doi.org/10.35595/2414-9179-2019-2-25-112-120>
 39. Л. В. Дашкевич, С. В. Бердников и В. В. Кулыгин, Водные ресурсы **44** (5), 563 (2017). <https://doi.org/10.7868/S0321059617040046>
 40. С. В. Бердников, в сб. *Закономерности экосистемных процессов в Азовском море*, под ред. Г. Г. Матишова (Наука, М., 2006), сс. 137–229.
 41. Д. А. Подойницын, Автореф. дис. ... канд. биол. наук (ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2010).
 42. Л. В. Кукарина, в сб. *Основные проблемы рыбного хозяйства и охраны рыбохозяйственных водоемов Азово-Черноморского бассейна* (АзНИИРХ, Ростов-на-Дону, 1996), сс. 183–186.
 43. А. В. Никитина, Т. В. Руднева, Т. В. Камышникова и др., Современные проблемы науки и образования, № 1, 1 (2015). URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=19509>
 44. В. В. Кулыгин, В. С. Герасюк и Л. В. Дашкевич, Информатика и космос, № 1, 120 (2018).
 45. Yu. Tyutyunov, R. Arditi, V. Buttiker, et al., Ecol. Modelling **69**, 19 (1993).
 46. А. Б. Медвинский, А. В. Русаков, А. Е. Бобырев и др., Биофизика **54** (1), 120 (2009).
 47. L. V. Nedorezov, Population Dynamics: Analysis, Modelling, Forecast **2** (4), 129 (2013).
 48. А. И. Абакумов, Информатика и системы управления **54** (4), 12 (2017).
 49. В. Г. Ильичев и О. А. Ильичева, Биофизика **63** (2), 373 (2018).
 50. В. Г. Ильичев и Л. В. Дашкевич, Компьютерные исследования и моделирование **11** (5), 879 (2019).
 51. G. P. Neverova, A. I. Abakumov, I. P. Yarovenko, and E. Ya. Frisman, Nonlinear Dynamics **94** (2), 827 (2018).
 52. И. И. Ворович, А. С. Горелов, А. Б. Горстко и др., *Рациональное использование водных ресурсов бассейна Азовского моря. Математические модели* (Наука, М., 1981).
 53. Г. Г. Матишов, Ю. М. Гаргопа, С. В. Бердников и С. Л. Дженюк, *Закономерности экосистемных процессов в Азовском море*, под ред. Г. Г. Матишова (Наука, М., 2006).
 54. S. V. Berdnikov, V. V. Selyutin, V. V. Vasilchenko, and J. F. Caddy, Fisheries Res. **42** (3), 261 (1999).

Long-Range Prediction of the Risk of Extinction Faced by the Pikeperch in the Azov Sea: Has the Prediction Come True?

Yu.V. Tyutyunov*, **, I.N. Senina***, L.I. Titova**, and L.V. Dashkevich*

*Federal Research Centre “The Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences”,
prosp. Chekhova 41, Rostov-on-Don, 344006 Russia

**Southern Federal University, prosp. Stachki 200/1, Rostov-on-Don, 344090 Russia

***Collecte Localisation Satellites, Space Oceanography Division (в русском варианте отсутствует),
rue Hermes 8-10, Ramonville Saint-Agne, 31520 France

In the late 1990s, based on stochastic simulations with a model of a long-range prediction of the dynamics of the Azov Sea pikeperch population identified from the 1950–1981 observational data including stocks, catches, temperature and salinities in the Azov sea, because the salinity of the seawater increases, a high probability of a risk of quasiextinction faced by the pikeperch population in the Azov Sea within 35 years from 1982 to 2016 was calculated. This probabilistic prediction has come true – the risk event occurred in the 2000s. Since 2005, the abundance of adult pikeperch did not exceed 4 million individuals. Since 2017, the pikeperch catch in the Azov Sea was completely forbidden. Nowadays, retrospective validation demonstrates that the model prediction is in a good (qualitative and quantitative) correspondence with the 1982–2018 observation data on dynamics of the pikeperch population. It has also been found that currently observed rise in annual average sea temperature has a negative impact on fish population dynamics and this phenomenon is no less significant than increase in salinity. According to a short-range prediction for 2019–2020, due to existing positive temperature and salinity anomalies, the ban on fishing introduced in 2017 is not enough to rebuild stocks of the Azov Sea pikeperch population in the coming years.

Keywords: Azov Sea, population dynamics, Sander Lucioperca L., stochastic model, Monte–Carlo method, risk of quasi-extinction

ПОРОГОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕТИНО–ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ТРАКТА УПРАВЛЕНИЯ ЦИРКАДИАННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЧЕЛОВЕКА СОЛНЕЧНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ

© 2020 г. А.В. Леонидов

E-mail: avleonidoff@mail.ru

Поступила в редакцию 05.03.2019 г.

После доработки 05.03.2019 г.

Принята к публикации 25.12.2019 г.

Обосновано использование дискретной модели порога при исследовании и описании неосознаваемых реакций организма человека и, в частности, при исследовании и описании характеристик ретино–гипоталамического тракта управления циркадианной активностью человека при воздействии солнечного излучения.

Ключевые слова: визуальная система, человек, порог, восприятие, непрерывная модель порога, дискретная модель порога, неосознаваемые реакции.

DOI: 10.31857/S0006302920020246

Визуальная система человека содержит в своем составе эволюционно древний тракт управления эндокринной системой с входящим в него ретино–гипоталамическом трактом управления циркадианной активностью человека солнечным излучением, а также возникший на более поздних этапах эволюционного развития тракт зрительно–восприятия.

В этих сенсорных системах прием и обработка информации о состоянии внешней среды возможны лишь при превышении энергетическими характеристиками оптического излучения Солнца некоторого порогового значения. Это пороговое значение связано не только с условиями восприятия и свойствами сенсорной системы, но и с характером конкретной задачи, решаемой сенсорной системой.

Модели порогов сенсорных систем наиболее подробно проработаны применительно к тракту зрительного восприятия визуальной системы человека.

Характеристикам порога в тракте управления нейроэндокринной системой человека и, в частности, в ретино–гипоталамическом тракте управления циркадианной активностью человека солнечным излучением до настоящего времени не уделялось должного внимания.

В настоящее время существуют две группы теорий порогов и построенных на их основе пороговых моделей. К первой группе теорий и моделей относится группа дискретных моделей порогов, в основе которых лежит классическая дис-

кретная теория порогов (например, работы [1, 2]), разработанная основоположником психофизики Г.Т. Фехнером [3]. Отличительной чертой теории [3] и построенных на ее основе моделей порогов является утверждение о наличии в сенсорной системе нижнего фиксированного значения энергии внешнего физического воздействия, ниже которого реакция организма человека отсутствует. Эта фиксированная граница рассматривается в качестве собственного порога сенсорной системы.

Ко второй группе теорий и моделей порогов относятся так называемые современные модели, основанные на работе [4] и построенные с использованием статистической теории принятия решений. В основе модели, представленной в работе [4], лежит утверждение о непрерывности реакций организма, вплоть до бесконечно малых значений вызывающих их внешних воздействий. В теориях и моделях, составляющих это направление, порог считается понятием операциональным [4] и вводится в качестве некоторого эмпирического показателя, полученного в результате проведенных по определенным правилам измерений.

Существующие теории порогов, принимая гипотезу о наличии порогов, не только расходятся в их толковании, но часто противопоставляют одно другому.

Сосуществование этих двух направлений объясняется тем, что в различных экспериментах находят подтверждение обе концепции порогов.

Непротиворечивость и, более того, органическое единство дискретной и непрерывной теории порогов было установлено в работах [5, 6], в которых применен единый подход к описанию дискретных и непрерывных моделей порогов на основе использования математического аппарата теории статистических решений.

Для определения характера порога в ретино-гипоталамическом тракте управления циркадианной активностью человека солнечным излучением рассматривались наиболее употребительные и наглядные одномерные модели процессов восприятия (на примере решения задачи обнаружения сигналов) – модель [4], представляющая группу непрерывных моделей порогов, и пороговая модель Фехнера [3], являющаяся типичным представителем дискретной модели порогов. Для определенности было принято, что сигнал предьявляется однократно.

Условные одномерные плотности вероятности в модели [4] при воздействии только гауссового шума N и при воздействии аддитивной смеси шума N с детерминированным сигналом S , т. е. в виде $S + N$, представляются следующими соотношениями:

$$\omega_1(x | N) = \frac{1}{\sigma_N \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(x - a_N)^2}{2\sigma_N^2} \right], \quad (1)$$

$$\omega_1(x | SN) = \frac{1}{\sigma_{SN} \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(x - a_{SN})^2}{2\sigma_{SN}^2} \right], \quad (2)$$

где σ_N и σ_{SN} – среднеквадратичное отклонение гауссового шума и смеси сигнала с шумом $S + N$. (при детерминированном сигнале S значения $\sigma_N = \sigma_{SN}$), a_N и a_{SN} – условные математические ожидания шума и аддитивной смеси сигнала с шумом ($a_N \leq a_{SN}$).

Гауссов шум N в соотношениях (1) и (2) является аддитивной смесью гауссового шума пространства объектов и гауссового собственного шума визуальной системы [5].

Явления, описываемые соотношениями (1) и (2), реализуются в некотором ограниченном сенсорном пространстве [1, 2, 7]. Границы сенсорного пространства в общем случае могут быть как неподвижными, так и подвижными. Границы этого пространства могут иметь лишь отражающий характер, поскольку в случае поглощающего характера хотя бы части границы сенсорного пространства нарушаются условия нормировки плотности вероятности (1) и (2) [7]. Поглощающий характер границы приводит к необратимому уменьшению плотностей вероятностей (1) и (2), что эквивалентно прекращению активности мозга и его смерти.

Математическая модель собственного шума с неподвижными отражающими границами описа-

на в работе [7]. Эта модель использована и при представлении образа шума внешнего пространства в сенсорном пространстве.

Для решения поставленной задачи далее использовали частный случай с нулевым числом отражений плотностей вероятностей от бесконечно удаленных отражающих границ сенсорного пространства, непосредственно следующий из модели [7].

В этом случае реализуется простое по форме отношение правдоподобия $\lambda(x)$, например, из работы [8], служащее мерой влияния информации, имеющейся во внешнем воздействии x , на принятие решения о наличии или отсутствии сигнала и представляющее собой частное от деления соотношения (2) на соотношение (1):

$$\lambda(x) = \exp \left[\frac{(x - a_N)^2 - (x - a_{SN})^2}{2\sigma^2} \right]. \quad (3)$$

В случае когда внешнее воздействие вызывает первую, осмысленную и, возможно, невербальную реакцию человека, выносится суждение о наличии реакции визуальной системы на внешнее воздействие. Решение о наличии или отсутствии сигнала S в смеси SN в этом случае принимается по решающему правилу:

$$\begin{cases} \lambda(x) \geq \lambda_n \rightarrow y \text{ (сигнал присутствует)} \\ \lambda(x) < \lambda_n \rightarrow n \text{ (сигнал отсутствует)} \end{cases}, \quad (4)$$

где λ_n – пороговое отношение правдоподобия, численное значение которого определяется используемым критерием принятия решения, формируемым в результате рассудочной деятельности человека.

Так как $\lambda(x)$ в выражении (3) представляет собой возрастающую монотонную функцию, пороговому значению отношения правдоподобия λ_n соответствует единственное значение операционного порога x_n :

$$x_n = \frac{\sigma^2 \ln \lambda_n + a_{SN} + a_N}{a_{SN} - a_N}. \quad (5)$$

Графики функций (1–3, 5) с учетом правила (4) приведены на рис. 1 и 2.

Из выражения (5) следует, что операционный порог x_n на оси воздействий оптического излучения при постоянных значениях среднеквадратичных отклонений $\sigma_N = \sigma_{SN} = \sigma$ и математических ожиданий a_N и a_{SN} определяется исключительно значением λ_n , которое соответствует тому или иному критерию принятия решений, используемому при решении конкретной задачи.

В рассматриваемой модели упомянутые критерии задаются целью решения задачи, определяющей решающую функцию, которая, в свою очередь, формирует решающее правило, позво-

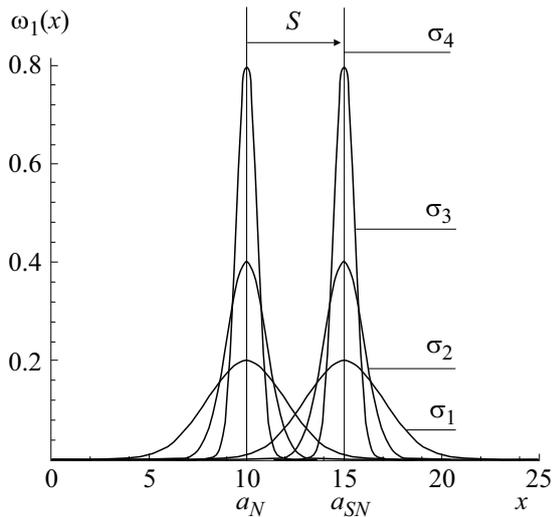


Рис. 1. Зависимости плотности вероятности при воздействии только гауссового шума (слева) и при воздействии аддитивной смеси гауссового шума N с детерминированным сигналом S (справа), $\sigma_1 > \sigma_2 > \sigma_3 > \sigma_4 = 0$.

ляющее произвести при каждом внешнем воздействии выбор того или иного решения в соответствии с соотношением (4).

Вероятностные характеристики процесса обнаружения при выбранном критерии принятия решения и соответствующем ему значению порогового отношения правдоподобия λ_n или операциональному порогу x_n вычисляются с использованием соотношений (1)–(5).

При этом вероятности реакции организма при наличии сигнала $P_1(y|SN)$ (правильное обнаружение), реакции организма y при отсутствии сигнала $P_1(y|N)$ (ложная тревога), отсутствие реакции организма на сигнал при его наличии $P_1(n|SN)$ (пропуск сигнала) и правильное отсутствие реакции организма при отсутствии сигнала $P_1(n|N)$ (правильное необнаружение) имеют следующий вид:

$$P_1(y|SN) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{x_n}^{\infty} \exp\left[-\frac{(x - a_{SN})^2}{2\sigma^2}\right] dx, \quad (6)$$

$$P_1(y|N) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{x_n}^{\infty} \exp\left[-\frac{(x - a_N)^2}{2\sigma^2}\right] dx, \quad (7)$$

$$P_1(n|SN) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_n} \exp\left[-\frac{(x - a_{SN})^2}{2\sigma^2}\right] dx, \quad (8)$$

$$P_1(n|N) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_n} \exp\left[-\frac{(x - a_N)^2}{2\sigma^2}\right] dx. \quad (9)$$

Из изложенного непосредственно следует, что непрерывная модель порогов сенсорных систем

справедлива в случаях, когда при восприятии внешних воздействий участвует рассудочная деятельность, реализуемая интеллектуальной сферой человека. В этом случае шум пространства объектов и собственный шум сенсорной системы оказывают влияние на процессы восприятия. Это относится, прежде всего, к зрительному процессу, предполагающему выработку и использование различных критериев оценки деятельности человека при построении в психике человека зрительной (предметной) модели внешнего Мира, а также к оценке, учету и последующей вербализации взаимосвязей различных параметров в этой модели Мира.

В пороговой модели [3] постулируется детерминированный характер событий и существование собственного (фиксированного) порога x_n сенсорной системы.

Первичная неосознаваемая реакция возникает при превышении энергии оптического излучения над некоторым порогом x_n . В дискретной модели порога сенсорной системы ответная реакция организма на внешнее воздействие описывается решающим правилом:

$$\begin{cases} x \geq x_n \rightarrow y \text{ (реакция присутствует)} \\ x < x_n \rightarrow n \text{ (реакция отсутствует)} \end{cases}. \quad (10)$$

Реакции, описываемые правилом (10), реализуются с условной вероятностью, равной единице. Это возможно лишь в том случае, когда одномерные условные интегральные функции распределения шума и аддитивной смеси сигнала с шумом представляют собой функции Хевисайда [9–11]:

$$P_1(x^*|N) = 1_+(x^* - a_N) = \begin{cases} 1 \text{ при } x^* \geq a_N \\ 0 \text{ при } x^* < a_N \end{cases}, \quad (11)$$

$$P_1(x^*|SN) = 1_+(x^* - a_{SN}) = \begin{cases} 1 \text{ при } x^* \geq a_{SN} \\ 0 \text{ при } x^* < a_{SN} \end{cases}. \quad (12)$$

Производные от условных вероятностей (11) и (12) описывают функции плотности условных вероятностей шума и сигнала в смеси с шумом в виде

$$\omega_1(x|N) = \delta(x - a_N), \quad (13)$$

$$\omega_1(x|SN) = \delta(x - a_{SN}), \quad (14)$$

где $\delta(\cdot)$ — дельта-функция Дирака [12].

Формально функция отношения правдоподобия в этом случае приобретает вид:

$$\lambda(x) = \frac{\delta(x - a_{SN})}{\delta(x - a_N)}. \quad (15)$$

Вероятностные характеристики рассматриваемого процесса, как и в случае модели [4], опреде-

ляются интегралами с использованием выражений (13) и (14).

Использование правила интегрирования с δ -функциями позволяет получить следующие выражения для условных вероятностей $P_1(y|SN)$, $P_1(y|N)$, $P_1(n|SN)$ и $P_1(n|N)$:

$$P_1(y | SN) = \int_{x_n}^{\infty} \delta(x - a_{SN}) dx = 1, \quad (16)$$

$$P_1(y | N) = \int_{x_n}^{\infty} \delta(x - a_N) dx = 0, \quad (17)$$

$$P_1(n | SN) = \int_{-\infty}^{x_n} \delta(x - a_{SN}) dx = 0, \quad (18)$$

$$P_1(n | N) = \int_{-\infty}^{x_n} \delta(x - a_N) dx = 1. \quad (19)$$

Как видно из выражений (16)–(19), полученные численные значения условных вероятностей полностью совпадают с аксиоматикой дискретной пороговой модели Фехнера.

В непрерывной модели [4] при $\sigma \rightarrow 0$ в соотношениях (1), (2) и (6)–(9) осуществляется переход от вероятностного к детерминированному описанию, но представленному в вероятностных терминах. При использовании известного соотношения [13]

$$\lim_{\sigma \rightarrow 0} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(x-a)^2}{2\sigma^2}\right] = \delta(x-a), \quad (20)$$

выражения (1) и (2) совпадают с выражениями (13) и (14), а выражения (6)–(9) совпадают с выражениями (16)–(19).

Из указанных совпадений непосредственно следует, что дискретная модель порога Фехнера [3] является результатом вырождения (при $\sigma \rightarrow 0$) непрерывной модели порога [4].

В качестве примера на рис. 1 показаны изменения функций (1) и (2) при условно выбранных значениях $a_N = 10$, $a_{SN} = 15$, т. е. при детерминированном сигнале $S = 5$, а также при значениях $\sigma \neq 0$ и $\sigma = 0$.

Соответствующие изменения функции отношения правдоподобия $\lambda(x)$ (5) при $a_N = 10$, $a_{SN} = 15$ (детерминированный сигнал $S = 5$), а также при значениях $\sigma \neq 0$ и $\sigma = 0$ показаны на рис. 2.

В непрерывной модели порога упомянутые критерии заданы целью решения конкретной задачи, определяющей решающую функцию, которая, в свою очередь, формирует решающее правило, позволяющее произвести при каждом воздействии выбор того или иного решения в соответствии с соотношением (4).

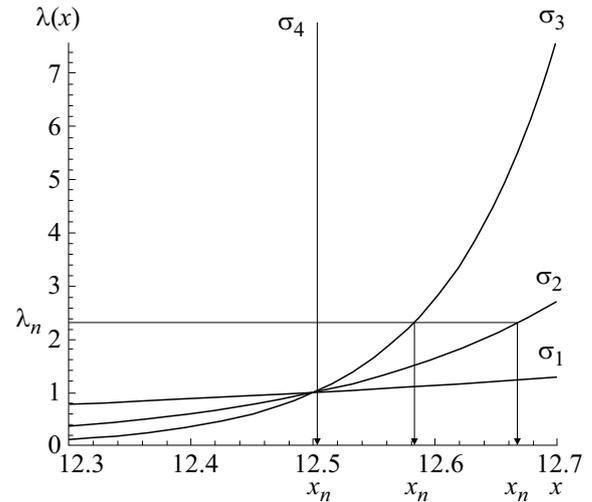


Рис. 2. Поведение функции отношения правдоподобия в окрестности $x = 12.5$ при различных значениях σ : для непрерывной модели порога при $\sigma_1 > \sigma_2 > \sigma_3$ для дискретной модели порога при $\sigma_4 = 0$.

Из рис. 2 следует, что в непрерывной модели порога при фиксированном критерии принятия решений и соответствующем ему фиксированному значению отношения правдоподобия λ_n значения операционального порога x_n могут быть различными. С другой стороны, порог x_n может иметь одно и тоже значение при различных критериях принятия решений, т. е. при различных значениях отношения правдоподобия λ_n .

Из предыдущего изложения также непосредственно следует, что постановка и формулирование конкретной задачи, выбор цели решения задачи, выбор решающей функции, формирование решающего правила, позволяющего произвести при каждом воздействии выбор того или иного решения в соответствии с соотношением (4), невозможно без рассудочной, интеллектуальной деятельности человека.

Очевидно, что условие неперемного использования рассудочной деятельности не позволяет использовать непрерывную модель порога при описании управления неосознаваемыми и неуправляемыми биологическими процессами и, в частности, при описании и моделировании управления циркадианной активностью организма человека солнечным излучением.

Из рис. 2 следует, что при $\sigma = 0$ функция $\lambda(x)$ сингулярна. Это означает отсутствие влияния осознаваемой, рассудочной деятельности на биологические процессы в организме человека, поскольку в этом случае не формируется ни цель, ни решающая функция и решающее правило, а также не производится выбор решения задачи управления циркадианной активностью. Очевидно, что сингулярность функции $\lambda(x)$ свидетельствует о незави-

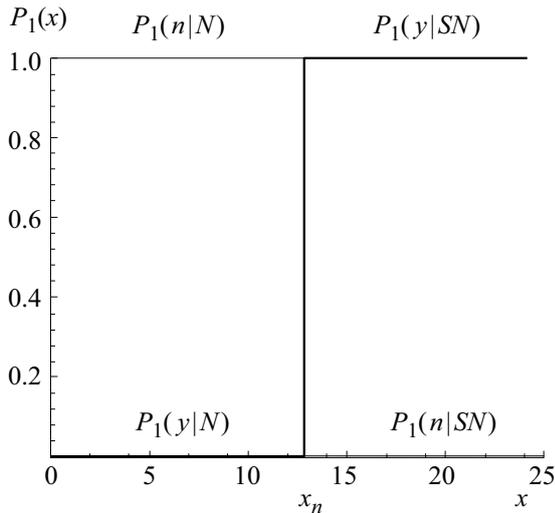


Рис. 3. Условные интегральные функции распределения шума и смеси сигнала с шумом в дискретной модели порога.

симости значения порога x_n в точке сингулярности от любых значений функции $\lambda(x)$. Указанное, в соответствии с рассматриваемым примером (рис. 2), относится к представлению дискретной модели порога в форме описываемой в терминах непрерывной модели порога, в которой всегда рассматривается случай $S \neq 0$. На рис. 2 значение сигнала $S = 5$. При $S \rightarrow 0$ функция $\delta(x - a_{SN})$ в выражении (14) стремится к $\delta(x - a_N)$ в выражении (13). При этом значение собственного порога x_n в дискретной модели порога совпадает с положением функции $\delta(x - a_N)$, описывающей детерминированный шум. Очевидно, что в этом случае, как и ранее при $S \neq 0$, не формируется ни цель, ни решающая функция и решающее правило, а также не производится выбор решения задачи управления циркадианной активностью. Очевидно также, что и в этом случае сингулярность функции $\lambda(x)$ свидетельствует о независимости значения порога x_n от любых значений функции $\lambda(x)$ в точке сингулярности и фиксированном положении x_n на оси x в положении детерминированного шума, т. е. $x_n = \delta(x - a_N)$.

Условные интегральные функции распределения шума и смеси сигнала с шумом в этом случае равны:

$$P_1(y | SN) = \int_{x_n}^{\infty} \delta(x - x_n) dx = 1 \quad (21)$$

при $x \geq x_n$ (правильное обнаружение),

$$P_1(y | N) = \int_{x_n}^{\infty} \delta(x - x_n) dx = 0 \quad (22)$$

при $x < x_n$ (ложная тревога),

$$P_1(n | SN) = \int_{-\infty}^{x_n} \delta(x - x_n) dx = 0$$

при $x \geq x_n$ (пропуск сигнала),

$$P_1(n | N) = \int_{-\infty}^{x_n} \delta(x - x_n) dx = 1 \quad (23)$$

при $x < x_n$ (правильное необнаружение),

что в точности соответствует дискретной теории и модели порога [3].

Графики соотношений (21)–(24) при $\delta(x - a_{SN}) \rightarrow \delta(x - a_N)$, т. е. при $S \rightarrow 0$, приведены на рис. 3.

Таким образом, дискретная модель порога описывает неосознаваемые процессы и явления, протекающие в биологических системах организма человека и, в частности, должна быть использована при описании и моделировании процессов управления циркадианной активностью человека солнечным излучением.

Сформулированный вывод позволяет использовать широко известные характеристики приемников оптического излучения сетчатки глаза, полученные с использованием дискретной модели порогов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К. В. Бардин, *Проблема порогов чувствительности и психофизические методы* (Наука, М., 1976).
2. Ю. М. Забродин и А. Н. Лебедев, *Психофизиология и психофизика* (Наука, М., 1977).
3. G. T. Fechner, *Elementen der Psychophysik. Leipzig: Breitkopf und Härtel* (Reprinted; Thoemmes Press, Bristol: 1999), v. 2, p. 559.
4. J. Swets, W. P. Tanner, and T. G. Birdsall, *Psychol. Rev.* **68**, 301 (1961).
5. А. В. Леонидов и А. К. Ежов, *Биофизика* **36** (4), 703 (1991).
6. А. В. Леонидов и А. К. Ежов, *Психол. журн.* **13** (2), 84 (1992).
7. А. В. Леонидов и А. К. Ежов, *Биофизика* **36** (3), 516 (1991).
8. Дж. Иган, *Теория обнаружения сигналов и анализ рабочих характеристик* (Физматлит, М., 1983).

9. И. К. Волков и А. Н. Канатников, *Интегральные преобразования и операционное исчисление: учеб. для вузов*, 2-е изд., под ред. В. С. Зарубина и А. П. Крищенко (Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, М., 2002).
10. *Методы классической и современной теории автоматического управления*, т. 1: *Математические модели, динамические характеристики и анализ систем автоматического управления*, 2-е изд., под ред. К. А. Пупкова и Н. Д. Егупова (Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана, М., 2004).
11. А. Н. Боголюбов и В. В. Кравцов, *Задачи по математической физике: учебное пособие* (Изд-во МГУ, М., 1998).
12. Л. Хёрмандер, *Анализ линейных дифференциальных операторов с частными производными* (Мир, М., 1986), т. 2.
13. Г. Корн и Т. Корн, *Справочник по математике для научных работников и инженеров* (Наука, М., 1984).

The Threshold Characteristics of the Retino-Hypothalamic Tract in the Regulation of Human Circadian Activity Rhythm by Solar Radiation

A.V. Leonidov

We demonstrate that a discrete threshold model can be used to study and describe unconscious reactions in the human body, particularly, when exploring and providing the characteristics of the retino-hypothalamic tract in the regulation of the human circadian activity rhythm by solar radiation.

Keywords: visual system, humans, threshold, perception, continuous threshold model, discrete threshold model, unconscious reactions

СТРУКТУРНЫЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ В ЖИДКОЙ ВОДЕ

© 2020 г. А.Н. Смирнов, А.В. Савин, А.С. Сигов

МИРЭА – Российский технологический университет, 119454, Москва, просп. Вернадского, 78

E-mail: a.n.smirnov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.01.2015 г.

После доработки 28.05.2015 г.

Принята к публикации 18.11.2019 г.

Изложены новые экспериментальные факты, свидетельствующие об образовании надмолекулярных комплексов воды – эмулонов с линейными размерами 1–100 мкм и временем релаксации выше одной секунды, состоящих из пяти фракций. Для доказательства их существования применены метод акустической эмиссии, оптический и термический методы. Разрушение эмулонов при повышении температуры порождает в водной среде солитоны. Обнаруженные новые структурные образования – эмулоны – вносят существенные коррективы в представления о строении и свойствах жидкой фазы воды.

Ключевые слова: структура воды, эмулоны, акустическая эмиссия, оптические определения, термический анализ, солитоны.

DOI: 10.31857/S0006302920010258

Для воды характерна ярко выраженная способность к самоорганизации вследствие образования водородных связей [1,2]. Структура жидкой воды была предметом обширных исследований [3–5]. Предложенные теории удовлетворительно объясняют только часть наблюдаемых явлений. Нами в тщательно очищенной воде обнаружено пять фракций надмолекулярных комплексов диаметром от 1 до 100 мкм. Они имеют характерные свойства, и для этих надмолекулярных образований наиболее подходит название «эмулоны». Размеры и пространственная организация эмулонов зависят от состава водных растворов, предыстории образцов воды и температуры. Эмулоны в воде образуют единую систему, построенную по фрактальному принципу. Фрактальную размерность системы эмулонов определили методом box-counting. Оказалось, что она равна 1.47–1.54.

Исследование процесса плавления льда [6, 7] позволило впервые обнаружить генерацию сигналов акустической эмиссии «талой» водой. Возникновение дискретных сигналов акустической эмиссии после полного плавления льда можно объяснить только структурными перестройками в «талой» воде. Талая вода некоторое время (до суток) может находиться в «активном» метастабильном состоянии. Объясняется это тем, что при плавлении льда кристаллическая структура разрушается быстрее, чем перестраивается в устойчивое равновесное состояние образовавшаяся из него «таялая вода». В талой воде концентрация ионов водорода и гидроксидов не прерыва-

тельное время сохраняется неравновесной – такой, какой она была во льду, т. е. лед плавится конгруэнтно. Поскольку реакция диссоциации воды $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^-$ протекает очень медленно (константа скорости этой реакции составляет всего $2.5 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ при температуре 20°C), время релаксации талой воды в равновесное состояние должно быть равно 10–17 ч, что и наблюдается на практике. Это служит причиной разговоров о «памяти» воды. «Память воды» следует понимать как зависимость ее свойств от предыстории и ничего больше. Ни о какой записи информации на воду речи быть не может. Можно перевести воду в активное состояние обработкой ультразвуком, замораживанием, нагреванием, кипячением, дезинтегрированием и др., но это всегда будут неустойчивые метастабильные состояния. Оптическим методом в талой воде обнаружено присутствие лишь фракции эмулонов с малыми размерами порядка 1–3 мкм. Этим и объясняется то, что она ускоряет биологические процессы в живых организмах [8] – мелкие структурные образования быстрее проникают через клеточные мембраны. Для визуализации эмулонов применен описанный ранее [9] метод с использованием лазерного излучения, который позволяет уловить незначительную разницу в показателях преломления двух «фаз» воды. Использовали гелий-неоновый лазер ЛГН-208А (Polyaron, Киев, Украина), мощностью 1.9 мВт, диаметр пучка лазерного излучения на расстоянии 40 мм – 0.6 мм, линей-

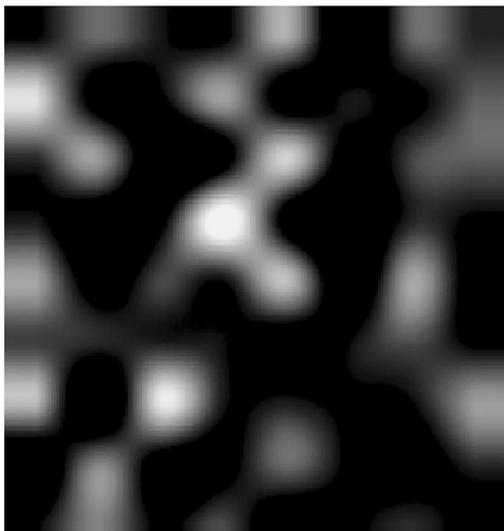


Рис. 1. Эмульоны в воде. Размер кадра 400×400 мкм.

ное отклонение луча относительно геометрической оси посадочных мест излучателя — 0.06 мм. Результаты получены в стандартных кварцевых флюорометрических кюветках. Они не зависели от использованной кюветы. Численное и массовое распределение эмульонов (размерные спектры) определяли с помощью лазерного малоуглового измерителя дисперсности Malvern 3600 Ec (Malvern, Великобритания). В опытах использована дистиллированная пирогенная вода, очищенная при помощи системы MilliQ Academic (Millipore, США). Воду фильтровали через ядерные фильтры с диаметром пор 0.2 мкм (ОИЯИ, Дубна Московской области). Для исследований ее использовали не ранее, чем через сутки. На рис. 1 приведен снимок, полученный при максимально достигнутом увеличении.

Ионы водорода $[H^+]$ и гидроксила $[OH^-]$ играют решающую роль в формировании эмульонов в воде. Гидратированные ионы $H^+ \cdot n_1 H_2O$ и $OH^- \cdot n_2 H_2O$ образуют ионные пары, из которых, вероятно, и строятся эмульоны, включающие до 10^7 – 10^9 этих частиц. На рис. 2 можно видеть постепенное уменьшение содержания в талой воде фракций эмульонов с небольшим диаметром (3–10 мкм) и увеличение количества фракций диаметром 70–100 мкм. Существование эмульонов подтверждено методом дифференциального термического анализа. На термограммах (см. рис. 3) обнаружены характерные пики, свидетельствующие о структурных изменениях, происходящих в системе. Наиболее значимые из них соответствуют температурам 75, 63, 54, 45 и 36°C. Это позволяет сделать вывод: жидкая вода является неоднородной системой, включающей как минимум

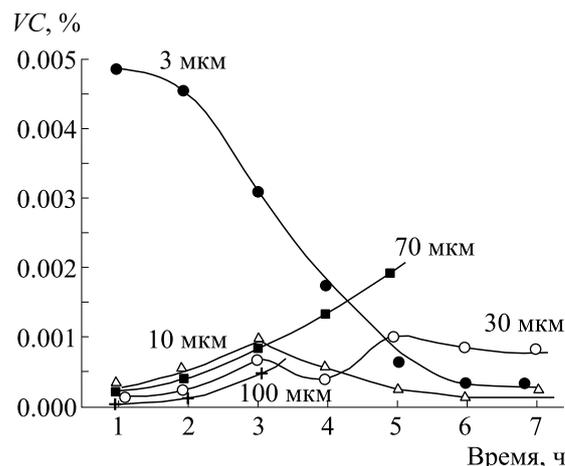


Рис. 2. Изменение содержания эмульонов в талой воде во времени.

пять типов микроструктурных образований. Повышение температуры выше порогового уровня приводит к их последовательному распаду. Самое замечательное состоит в том, что эти температуры точно совпадают с характерными температурами, при которых скорость звука в воде и плотность воды максимальны, адиабатическая сжимаемость воды и ее теплоемкость минимальны, а также с другими аномальными точками воды [10, 11], что не может быть случайным. Разрушение эмульонов может сопровождаться возникновением солитонов. Качественно это явление можно описать с помощью модели ϕ -4 с асимметрическим двухъямным потенциалом $V(u)$ [12]. Данная модель представляет цепочку из эмульонов, которая может находиться в нескольких устойчивых состояниях. При низких температурах основным будет состояние, при котором все эмульоны находятся в более глубокой яме, а при высоких — состоянии, при котором часть из них распалась, а остальные находятся в более широкой яме. Результаты численного моделирования образования солитона в цепочке из $N = 1000$ звеньев при повышении температуры $T > T_0$, где T_0 — температура основного состояния цепи, приведены на рис. 4. Такой переход сопровождается распространением по цепи топологического солитона, обусловленного локальным переходом из одного состояния в другое. Сложная организация структуры воды как единого ансамбля, включающего в себя надмолекулярные комплексы, приводит к тому, что свойства водной системы не оказываются простой суммой свойств отдельных структурных элементов, а возникает новое качество — свойство кооперативности. В таком ансамбле отдельные структурные элементы могут менять свою форму и размеры согласованно. Это подтверждается опытами. Именно такой сценарий

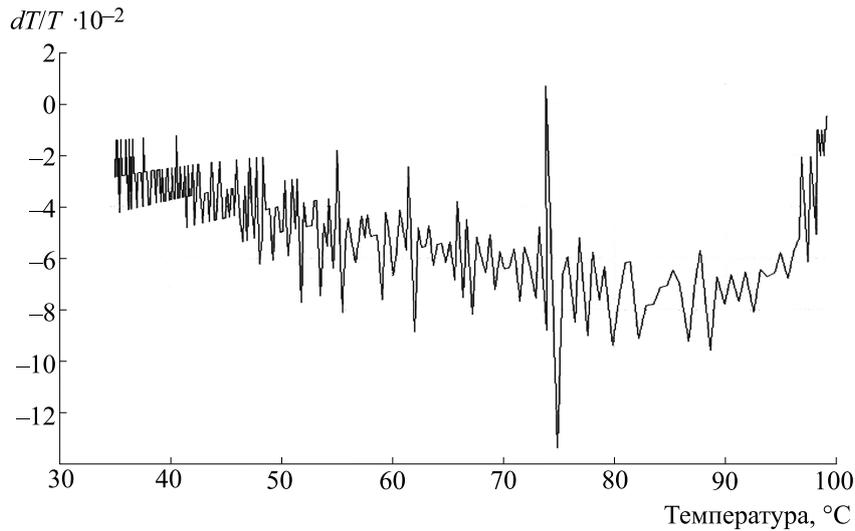


Рис. 3. Относительное изменение температуры при нагревании воды. Выше этой температуры вода становится гомогенной системой, дальнейший нагрев не приводит к генерации солитонов.

изменения структуры воды можно наблюдать экспериментально при нагреве дна длинного цилиндрического сосуда, заполненного водой и поставленного вертикально на нагреваемую поверхность. При равномерном освещении на фоне экрана с периодической структурой в некоторый момент времени образуется равномерно движущаяся вдоль сосуда светлая полоска — солитон. Эффект повторяется пять раз, до достижения температуры 75°C.

Полидисперсная структура эмулонов, существующая в воде, приводит к полимодальному отклику на внешние воздействия, проявлению гистерезисных явлений и значительным временам релаксации.

Распад эмулонов сопровождается некоторым сокращением объема воды. Это хорошо заметно на графике, представленном на рис. 5. Несколько ступенек на кривой свидетельствуют о фазовых превращениях в жидкой воде. На графике изменения объема воды при повышении температуры хорошо заметны небольшие максимумы, обусловленные последовательным распадом эмулонов. Замечательно, что они очень хорошо коррелируют с тепловыми эффектами, выявляемыми методом дифференциально-термического анализа (см. рис. 3). Это позволяет утверждать, что распад эмулонов является фазовым переходом первого рода. Небольшие расхождения связаны со значительным гистерезисом, разными объемами

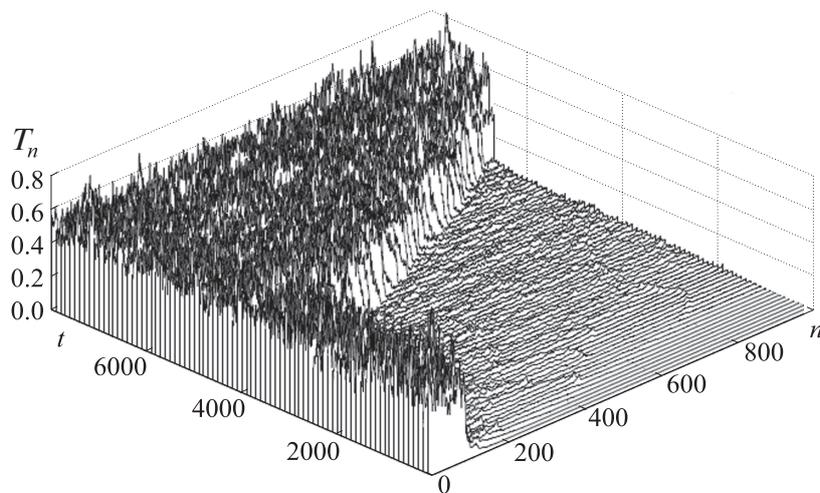


Рис. 4. Зависимость от времени t состояний M_n цепей n из $N = 1000$ эмулонов при повышении температуры.

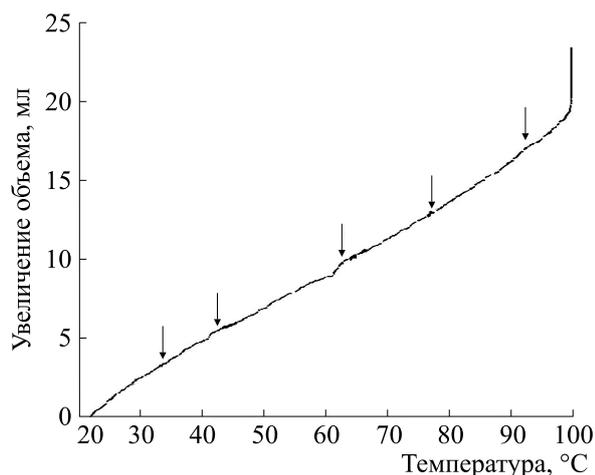


Рис. 5. Расширение воды при нагревании.

образцов, инерционностью системы измерений и другими чисто техническими моментами.

Становится понятно, почему жидкая вода легко меняет свойства при воздействии различных факторов иногда очень малой интенсивности. На изменения структуры водных растворов в процессе исследований следует обращать серьезное внимание, особенно при биологических опытах, поскольку вода, в большинстве случаев, является первичной мишенью многих воздействий на биологические системы.

Обнаруженные новые структурные образования — эмулоны — вносят существенные коррективы в представления о структуре воды. Наличие их в воде непротиворечиво включает в себя и объясняет все ранее полученные экспериментальные факты. Эмулоны позволяют объяснить многие явления, которые ранее не имели стройного, на-

учного обоснования и предсказать ряд новых эффектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Г. Л. Зацепина, *Физические свойства и структура воды* (Изд-во МГУ, М., 1998).
2. Д. Эйзенберг и В. Кауцман, *Структура и свойства воды* (Гидрометеиздат, Л., 1975).
3. Т. Эрдеи-Груз, *Явления переноса в водных растворах* (Мир, М., 1976).
4. О. Я. Самойлов, *Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов* (Изд-во АН СССР, М., 1957).
5. В. Я. Антонченко, А. С. Давыдов и В. С. Ильин, *Основы физики воды* (Наук. думка, Киев, 1991).
6. А. Н. Смирнов, *Рос. хим. журн.* **45**, 29 (2001).
7. Д. М. Кузнецов, В. Л. Гапонов и А. Н. Смирнов, *Инженерная физика*, № 1, 16 (2008).
8. М. А. Аскоченская и Н. С. Петин, *Успехи соврем. биологии* **73** (2), 288 (1972).
9. А. Н. Смирнов, *Физика живого* **18** (2), 5 (2010).
10. *Физические величины. Справочник* (Энергоатомиздат, М., 1991).
11. E. Lopez and W. Ortiz, *Chem. Phys. Let.* **287** (3–4), 429 (1998).
12. A. V. Savin, G. P. Tsironis, and A. V. Zolotaryuk, *Phys. Rev. E* **56** (3), 2457 (1997).

Structural Transformation in Liquid Water

A.N. Smirnov, A.V. Savin, and A.S. Sigov

MIREA – Russian Technological University, prosp. Vernadskogo 78, Moscow, 119454 Russia

This study reports novel experimental evidence for the formation of water supramolecular complexes (solvent molecules) ranging from 1 to 100 μm in size with five fractions of solvent molecules the relaxation time of which was faster than one sec. Optic sensors, acoustic emission technique and thermal analysis were employed to provide a confirmation of it. When the temperature increases, the decomposition of the solvent molecule leads to generation of a solutant in an aqueous solution. The observed novel structural formations — solvent molecules considerably contribute to the understanding of a structure and properties of water liquid phase.

Keywords: structure of water, solvent molecule, acoustic emission, optic sensors, thermal analysis, solutant

ЭЛЕКТРОН-КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ВОЗБУЖДЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ В ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЯХ

© 2020 г. Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.07.2018 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята к публикации 19.09.2019 г.

Проведен анализ энергетического профиля процесса ферментативного катализа. Сделано заключение, что использование феноменологического уравнения Аррениуса и равновесных термодинамических параметров теории активированного комплекса Эйринга не позволяет адекватно объяснить механизм катализа. В фермент-субстратном комплексе в ходе всех стадий в реальности резко нарушается максвелл-больцмановское распределение молекул по энергиям, что эквивалентно мгновенному повышению локальной неравновесной температуры. Ферментативные стадии не являются равновесными и изотермическими. Сорбция субстрата на ферменте приводит (за счет нейтрализации зарядов или диполей) к локальному высвобождению большой энергии, достаточной для разрыва ковалентной связи или переноса электрона с образованием переходного электрон-колебательно-возбужденного комплекса. Именно энергия этих комплексов обеспечивает протекание дальнейших, более медленных, стадий (перегруппировка или перенос атомов, десорбция продукта). Ферментативные реакции идут через образование неравновесных электрон-колебательных возбужденных комплексов, кинетически не подчиняющихся термодинамике в стиле Эйринга.

Ключевые слова: ферменты, катализ, энергия активации, уравнение Аррениуса, переходный комплекс, теория Эйринга, электронно-возбужденные состояния.

DOI: 10.31857/S000630292002026X

ФЕНОМЕН КАТАЛИЗА

Феномен катализа – колоссального (в тысячи и миллионы раз) увеличения скорости – является одним из важнейших признаков ферментативных реакций [1, 2]. С термодинамической точки зрения катализ обусловлен двумя факторами – энтальпийным (энергетическим) и энтропийным (стерическим) [3, 4]. Первый из них заключается в энергетическом выигрыше при присоединении субстрата к ферменту в ходе нейтрализации (частичной или полной) разноименных зарядов, а также в ходе образования ионных и водородных связей. Второй заключается в том, что, соединяясь с ферментом, субстрат в значительной степени очищается от водной «шубы» и располагается в пространстве нужным образом. При этом фермент ограничивает число степеней свободы, направляя реакцию вдоль определенной пространственной координаты.

Сокращение: ЭКВК – электрон-колебательный возбужденный комплекс.

ОБ УРАВНЕНИЯХ АРРЕНИУСА И ЭЙРИНГА

Традиционные представления об энергетическом профиле ферментативных процессов [1–4] основаны на феноменологическом уравнении Аррениуса, предложенном еще в позапрошлом веке, и теории переходного активированного комплекса, предложенной Г. Эйрингом в середине прошлого века. В уравнении Аррениуса фигурируют энергия активации и температура, экспоненциально связанные со скоростью реакции. В уравнении Эйринга фигурируют термодинамические параметры – свободная гиббсовская энергия, энтропия, энтальпия, а также температура, причем эти параметры приписаны субстрат-ферментному переходному комплексу [5]. В основе теории Эйринга лежит, в частности, постулат о том, что во время течения реакции не нарушается максвелл-больцмановское распределение молекул по энергиям. Иными словами, в активных центрах ферментов не должно появляться неравновесных «горячих» промежуточных комплексов или продуктов, температура которых отличалась бы от температуры среды [4, 5].

Формальная замена аррениусовской энергии активации на свободную энергию Гиббса, сделанная Эйрингом и соавторами [5], не имеет физического смысла, ибо термодинамика применима только для нахождения баланса процесса, но не для описания пути реакции, ее механизма. Использование уравнения Аррениуса и теории Эйринга не позволяет адекватно объяснить понижение энергетического активационного барьера ферментом.

ВОЗБУЖДЕННЫЕ СОСТОЯНИЯ

Никаких экспериментальных доказательств постулата Аррениуса об особых «активных молекулах» и постулата Эйринга о равновесном распределении по энергии в ходе катализа не существует. Наоборот, во множестве каталитических реакций найдены неравновесные электронные и колебательные возбужденные состояния, детектируемые по хемилюминесценции [6], биолюминесценции [7] и инфракрасному излучению [8–10]. В ходе обычных ферментативных процессов в ряде случаев регистрируется сигнал электронного парамагнитного резонанса [11, 12], что говорит о наличии триплетных возбужденных состояний. Введя акцептор энергии, можно по его излучению выявить наличие таких состояний, как это было сделано, например, для пероксидазы [13].

ЧИСЛО АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

При повышении температуры на 10 градусов, как известно, скорость ферментативных реакций возрастает как минимум вдвое [1, 2]. Аррениус и затем Эйринг объясняли это возрастанием доли «активных» молекул. Такое объяснение ошибочно. Например, при 300 К и 310 К различие составляет 1,03 раза, но никак не 2 раза. Это элементарно находится при объединении двух аррениусовских уравнений:

$$a_1/a_2 = \exp\{E_{\text{иа}}(T_2 - T_1)/(RT_1 T_2)\}, \quad (1)$$

где $E_{\text{иа}}$ – истинная энергия активации, a_1 – количество активных молекул при температуре T_1 , a_2 – количество активных молекул при повышенной температуре T_2 .

РОЛЬ ВЯЗКОСТИ

На самом деле увеличение скорости работы ферментов при некотором повышении температуры в значительной степени обусловлено тривиальным диффузионным фактором – понижением вязкости растворителя [14, 15]. Например, при увеличении температуры от 10 до 30°C вязкость воды падает от 1.3 до 0.8 пуаз [16]. Кроме того, повышение температуры уменьшает микровязкость

белковой глобулы и повышает ее конформационную подвижность [17]. Указанные обстоятельства ни Аррениусом, ни Эйрингом в расчет не принимались.

ЭНЕРГИЯ АКТИВАЦИИ

В уравнение Аррениуса принято подставлять температуру среды (T) и считать ее неизменной в ходе всех элементарных стадий ферментативного процесса. Измеряя зависимость скорости реакции от T , можно найти некоторую энергию активации E_a . Как было показано в работе [18], эта E_a является кажущейся и не имеет прямого отношения к истинной энергии активации – энергии, необходимой для начала протекания реакций внутри субстрат-ферментного комплекса. Автор работы [18] правильно указал на некорректность аррениусовской интерпретации и на неприменимость равновесной термодинамики для описания работы ферментов. Истинная энергия активации – это энергия, необходимая для преодоления активационного барьера реакции, т. е. для активации субстрата, а кажущаяся – та, которая определяется по уравнению Аррениуса из зависимости скорости при разных температурах. Кажущаяся энергия активации обусловлена прежде всего диффузионными факторами, вязкостью среды [14], а также микровязкостью самого фермента.

ЭЛЕКТРОННЫЕ И ЯДЕРНЫЕ ПЕРЕХОДЫ

Еще один недостаток теории Эйринга состоит в том, что в качестве «координаты реакции» рассматривается расстояние между ядрами, а нужно брать расстояние между ядрами и электронами. Ведь в первую очередь именно электронные орбитали участвуют во взаимодействиях [19]. Электронные переходы происходят мгновенно, а ядра затем медленно перестраиваются в новую конфигурацию [20]. Авторы работы [20] четко указали на роль возбужденных состояний в ферментативных реакциях и даже рассчитали этот вклад для некоторых реакций, но при этом они не рассматривали процессы как неравновесные, идущие при высокой внутримолекулярной температуре. Энергетический вклад ядерных (колебательных) движений на порядок меньше, чем электронных. При этом электрон-колебательные переходы квантованы, дискретны, что принципиально отличается от непрерывной траектории движения в теории Эйринга.

ЭНЕРГИЯ ХЕМОСОРБЦИИ

При сорбции субстрата на ферменте высвобождается большой квант энергии хемосорбции $E_{\text{хем}}$ [4, 20], который заведомо превышает величину E_a . Этот квант почти весь используется для

безактивационного протекания дальнейших стадий. При полной нейтрализации двух разноименных электрических зарядов величина $E_{\text{хем}}$ может быть найдена по следующему уравнению:

$$E_{\text{хем}} = 2.15 \times 10^6 N q_1 q_2 / r \epsilon, \quad (2)$$

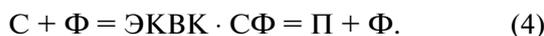
где q_1 и q_2 – величины положительного и отрицательного заряда, N – число Авогадро, r – конечное расстояние между нейтрализующимися зарядами, ϵ – диэлектрическая проницаемость (причем не внешней среды, а групп субстрата и активного центра фермента). При $r = 1,5 \text{ \AA}$ (длина ковалентной связи) и $\epsilon = 1$ получаем максимальную $E_{\text{хем}} = 250$ ккал/моль. Этой энергии достаточно для разрыва любой ковалентной связи. Для ферментов можно брать именно $\epsilon \sim 1$, так как молекулы воды ($\epsilon = 81$) обычно не помещаются между нейтрализующимися группами. При неполной нейтрализации зарядов (диполи и т. д.) и при $\epsilon > 1$ величина $E_{\text{хем}}$ может оказаться меньше, но все равно она выше энергии активации. Формулу по нейтрализации зарядов можно использовать для конкретных ферментативных реакций, если известны заряды и дипольные моменты, расстояния и диэлектрическая постоянная.

ЭЛЕКТРОН-КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ ВОЗБУЖДЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Величина $E_{\text{хем}}$ связана с энтальпийным членом ΔH гиббсовской свободной энергии ΔG . Не вся $E_{\text{хем}}$ тратится для совершения полезной работы, ибо небольшая часть теряется в тепло. Теплота сорбции ΔH (энтальпия), измеряемая калориметрически, представляет собой малую потерянную энергию:

$$\Delta H = E_{\text{хем}} - E^*, \quad (3)$$

где E^* – энергия переходного электрон-колебательного возбужденного комплекса (ЭКВК). Потеря небольшой (колебательной) части энергии в тепло при сорбции субстрата (С) на ферменте (Ф) обеспечивает необратимость протекания дальнейших стадий. При этом обратимость ферментативной реакции, как таковой, сохраняется (прямой и обратный путь совпадают):



Возникший ЭКВК быстро перестраивается и затем трансформируется в продукт (П). Это происходит раньше, чем ЭКВК успеет релаксировать в равновесное состояние. Именно энергия ЭКВК в конечном счете обеспечивает протекание дальнейших стадий – перегруппировку, перенос электронов или групп, десорбцию продукта реакции.

Не случайно в монографии М.В. Волькенштейна с соавторами [20] для описания энергетического

профиля ферментативных реакций были привлечены представления о том, что в активном центре фермента происходит смешивание молекулярных орбиталей основного и возбужденного состояния субстрата, изменяющие его геометрию, дипольный момент и рК.

Нужно отметить, что отсутствие свечения в ходе большинства ферментативных реакций вовсе не означает отсутствия ЭКВК. В таких реакциях энергия ЭКВК не высвечивается (в ультрафиолетовой или видимой области), а запасается в продукте и частично теряется в виде теплового инфракрасного излучения, поглощаемого водой.

ЛОКАЛЬНАЯ НЕРАВНОВЕСНАЯ ТЕМПЕРАТУРА

Ферментативные реакции не являются равновесными и изотермическими, поскольку в их ходе возбуждаются электронные степени свободы (с энергиями порядка 100 ккал/моль) или (и) колебательные (с энергиями порядка 10 ккал/моль).

Фермент понижает активационный барьер за счет возникновения ЭКВК. В ходе всех стадий сильно нарушается максвелл-больцмановское распределение молекул по энергиям, повышается локальная (неравновесная) температура в активном центре. Фермент всегда ведет реакцию при высокой неравновесной внутримолекулярной температуре. Локальная температура субстрата и активного центра совпадает с температурой среды только до и после каталитического акта, но в ходе акта – сильно не совпадает.

Здесь нужно особо заметить, что широко распространено мнение о том, что температура является мерой средней кинетической энергии, является далеко не полным. Это мнение верно для газов, где межмолекулярные взаимодействия пренебрежимо малы, а электронные и колебательные уровни не заселены. На самом же деле температура является мерой заселения всех степеней свободы молекул – вращательных, поступательных, колебательных и электронных [15, 21]. Например, при фотовозбуждении молекул в ультрафиолетовой и видимой области основной вклад дают электронные переходы, соответствующие неравновесным температурам в несколько тысяч градусов [17, 21].

ТЕМПЕРАТУРА, ЭНЕРГИЯ, ВОЛНОВОЕ ЧИСЛО, ЧАСТОТА

При 300 К средняя энергия молекул составляет, как известно, всего 0.6 ккал/моль [15], т.е. соответствует энергии поступательных и вращательных степеней свободы. В шкале волновых чисел 0.6 ккал/моль – это 200 см^{-1} , т.е. это дальний инфракрасный диапазон; в шкале частот это 10^{-12} с.

Если взять $\nu = 2000 \text{ см}^{-1}$ (6 ккал/моль), то в шкале частот это 10^{-10} с, т. е. это колебательные переходы. Если взять $\nu = 20000 \text{ см}^{-1}$ (60 ккал/моль), то получаем 10^{-9} с – типичное время жизни электронно-возбужденного состояния [17]. Именно за такое время осуществляется элементарный акт ферментативного катализа. Скорость же всей полной ферментативной реакции лимитируется самой медленной стадией – десорбцией продукта [1, 3, 17].

Пользуясь простой формулой Вина для спектра излучения при некоторой температуре [21] (или точнее – формулой Планка) и зная энергию излучаемых квантов ($E = h\nu$), можно найти неравновесную температуру ($E = kT$). Электронные переходы соответствуют неравновесным локальным температурам в несколько тысяч градусов. Например, для биолюминесценции в желтой области спектра неравновесная температура составляет около 5000 К.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Во всех обычных «темновых» ферментативных реакциях (а не только в биолюминесцентных и фотохимических) активный центр сильно «разогревается» субстратом, в результате чего облегчается не только энергетическая составляющая, но и стерическая, так как разогрев увеличивает динамику, подвижность активного центра и облегчает десорбцию продукта.

Скорость ферментативной реакции в растворе лимитируется диффузией и стерическими факторами, но элементарные стадии катализа являются по сути мономолекулярными, похожими на известные термохимические реакции, не подчиняющимися теории Эйринга, ибо они идут по не изотермическому пути и сопровождаются высвобождением квантов энергии 10–50 ккал/моль [22, 23].

Протекание структурных изменений на стадиях ферментативных реакций удается описывать методами молекулярной динамики [24]. При этом энергетический профиль обычно имеет стадии с энергиями 5–20 ккал/моль, которые существенно выше равновесных (0.6 ккал/моль). Результаты расчетов методами равновесной молекулярной динамики, как отмечено в работе [24], часто не совпадают с экспериментальными данными.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Диксон и Э. Уэбб, Ферменты (Мир, М., 1982).
2. А. Ленинджер, Основы биохимии (Мир, М., 1985).
3. Э. Фёршт, Структура и механизм действия ферментов (Мир, М., 1980).
4. Г. И. Лихтенштейн, Многоядерные окислительно-восстановительные металлоферменты (Наука, М., 1979).
5. С. Глесстон, К. Лейдлер и Г. Эйринг, Теория абсолютных скоростей реакций (ИЛ, М., 1948).
6. А. Kricka and J. Larry, Anal. Chem. **67** (12), 499R (1995).
7. О. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* (World Scientific, 2006).
8. P. Woerkom and R. Groot, Appl. Optics **21** (17), 3114 (1982).
9. J. I. Steinfeld, J. S. Francisco, and W. L. Hase, *Chemical Kinetics and Dynamics* (Prentice-Hall, 1998).
10. S. Torres, H. Mella, C. Reyes, et al., Appl. Optics **54** (8), 2057 (2015).
11. B. Commoner, B. Lippincott, and J. Passonneau, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **44**, 1099 (1958).
12. T. Hollocher and B. Commoner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **46**, 416 (1960).
13. Y. Cilento, Photochem. Photobiol. **5**, 199 (1980).
14. И. Б. Заводник, Биофизика **36** (1), 46 (1991).
15. П. Эткинс, Физическая химия (Мир, М., 1980), т. 2.
16. Краткий справочник физико-химических величин (Химия, Л., 1974).
17. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
18. Л. А. Блюменфельд, Проблемы биологической физики (Наука, М., 1974).
19. Л. А. Грибов, От теории спектров к теории химических превращений (УРСС, М., 2001).
20. М. В. Волькенштейн, И. Б. Голованов и В. М. Соболев. Молекулярные орбитали в энзимологии (Наука, М., 1982).
21. Дж. Тригг, Решающие эксперименты в современной физике (Мир, М., 1974).
22. B. Hartke and J. Manz, J. Am. Chem. Soc. **110**, 3063 (1988).
23. J. Polanyi, Science **236** (4802), 680 (1987).
24. А. В. Немухин, Б. Л. Григоренко, С. В. Луцкекина и С. Д. Варфоломеев, Успехи химии **81**, 1011 (2012).

Electronically-Vibrationally Excited Complexes in Enzymatic Reactions

N.L. Vekshin

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

An analysis of the energy profile of enzymatic catalysis has been done. It is concluded that the use of the phenomenological Arrhenius equation and the equilibrium thermodynamic parameters of Eyring's theory of an activated complex does not adequately explain the mechanism of catalysis. In the enzyme-substrate complex during all stages, the Maxwell-Boltzmann energy distribution of molecules is sharply disturbed in reality, it is proportional to an instantaneous increase in local non-equilibrium temperature. Enzymatic stages are not equilibrium and isothermal. Sorption of the substrate on the enzyme leads (due to the neutralization of charges or dipoles) to the local release of high energy, sufficient to break the covalent bond or electron transfer with the formation of a transition electronically excited complex. The energy of electronically-vibrationally excited complex is needed for the normal progression of subsequent, more slower stages (rearrangement or transfer of atoms, desorption of the product). Enzymatic reactions proceed through the formation of non-equilibrium electronically-vibrationally excited complexes, which kinetically fail to obey the thermodynamics of the Eyring theory.

Keywords: enzymes, catalysis, activation energy, Arrhenius equation, transition complex, Eyring theory, electronically-vibrationally excited states