ISSN 2499-9962

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Актуальные вопросы биологической физики и химии

Том 3, № 3
2018

Севастополь

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ

Научный журнал

Том 3, № 3
2018

RUSSIAN JOURNAL of BIOLOGICAL PHYSICS and CHEMISTRY

Volume 3, No. 3, 2018

Севастополь
2018

Учредитель и издатель
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация

«Актуальные вопросы биологической физики и химии» – научный журнал, посвященный актуальным вопросам общей и молекулярной биофизики, нанобиофизики, экологической биофизики, а также современным проблемам биоорганической, биофизической и медицинской химии. Издание рассчитано на научных работников, аспирантов, студентов.

Журнал зарегистрирован в Международном центре ISSN (ISSN 2499-9962), Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (свидетельство ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018), индексируется в библиографической базе данных научных публикаций российских ученых (РИНЦ). Издается с апреля 2016 г. С 2018 г. выходит 4 раза в год.

Издан при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-04-20061).

Главный редактор
Евстигнеев М.П. (Севастополь).

Научный редактор
Твердислов В.А. (Москва).

Редакционная коллегия
Артюхов В.Г. (Воронеж);
Барановский С.Ф. (Севастополь);
Бержанский В.Н. (Симферополь);
Кожевников В.Н. (Ньюкасл, Великобритания);
Костюков В.В. (Севастополь);
Нечипуренко Ю.Д. (Москва);
Паркинсон Дж. (Глазго, Великобритания).
Песик Я. (Гданск, Польша);
Солдатов А.А. (Севастополь);
Эрнандес Сантьяго А.А. (Пуэбла, Мексика).

Ответственный секретарь
Воронин Д.П. (Севастополь).

Chief Editor
Evstigneev M.P. (Sevastopol).

Science Editor
Tverdislov V.A. (Moscow).

Editorial Board
Artyuhov V.G. (Voronezh);
Baranovskiy S.F. (Sevastopol);
Berzhansky V.N. (Simferopol);
Kozhevnikov V.N. (Newcastle, UK);
Kostjukov V.V. (Sevastopol);
Nechipurenko Yu.D. (Moscow);
Parkinson J. (Glasgow, UK);
Pesic Ya. (Gdansk, Poland);
Soldatov A.A. (Sevastopol);
Hernandez Santiago A.A. (Puebla, Mexico).

Executive Secretary
Voronin D.P. (Sevastopol).

Рекомендован к печати Ученым советом ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет».

© ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Том 3, № 3, 2018

ОБЩАЯ БИОФИЗИКА

А.М. Шахов, А.А. Осыченко, А.А. Астафьев, Г.А. Серобян, В.А. Надточенко
Внутриклеточный транспорт в ооцитах мыши при слиянии фемтосекундными лазерными импульсами 467

С.Н. Железнова, Р.Г. Геворгиз, А.С. Малахов
Взаимосвязь концентраций фукоксантина и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin 472

П.Д. Котова, Д.С. Ивашин, С.С. Колесников
Агонист-индуцируемая Ca^{2+} сигнализация в мезенхимных стромальных клетках 476

Е.В. Немцева, М.А. Герасимова, О.О. Лащук, Н.Е. Карузина, Д.В. Гульнов, Б.С. Мельник
Использование время-разрешенной флуоресценции белков для определения стадий их денатурации 484

М.А. Суслов, А.В. Анисимов
Динамика роста и межклеточного водного переноса в интактных корнях кукурузы при изменении газового состава атмосферы 489

М.С. Сырчина, А.Д. Залесский, А.А. Осыченко, А.А. Астафьев, А.В. Айбуш, В.Н. Надточенко
Исследование вязкоупругих свойств нуклеоплазмы ооцитов млекопитающих с применением оптического захвата 495

Р.А. Гуськова, Н.С. Васильев, А.В. Локтюшкин, И.И. Иванов
Влияние длины углеводородных цепей мембранных липидов, латерального давления и концентрации холестерина на проницаемость мембран для кислорода 499

А.В. Костарев, В.В. Мустяца, А.В. Творогова, Ф.И. Атауллаханов, Н.Б. Гудимчук, И.А. Воробъев
Тонкая структура и динамика профилей EB3 на микротрубочках в клетках фибробластов 504

В.И. Лобышев
О чем говорят изотопные эффекты тяжелой воды в биологических и модельных системах 511

А.П. Черкашин, О.А. Рогачевская
Возможные механизмы регуляции потенциал-зависимого входа Ca^{2+} во вкусовых клетках типа III 520

Е.В. Малышко, В.А. Твердислов
Молекулярные машины как иерархические хиральные конструкции 526

А.Э. Сидорова, В.А. Твердислов
Биофизическая модель самоорганизации биосферы как иерархии активных сред 531

МОДЕЛИРОВАНИЕ В БИОФИЗИКЕ

П.Е. Гаврилов, А.А. Костылев, А.С. Лелеков, А.С. Малахов
Продуктивность и КПД фотобиосинтеза *Spirulina (Arthrospira) platensis* при различном спектральном составе светодиодного излучения 535

Р.П. Тренкеншу, А.С. Лелеков
Соотношение резервных и структурных компонентов биомассы как ключевой параметр роста микроводорослей 541

А.А. Чекушкин, А.С. Лелеков, Р.П. Тренкеншу
Автоматической датчик регистрации суточных колебаний освещённости в районе г. Севастополя 547

А.С. Малахов, Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова
Моделирование распределения света на рабочей поверхности фотобиореактора для микроводорослей 553

С.А. Муслов
Poisson's ratio of dentin and enamel as anisotropic media with hexagonal symmetry 561

А.А. Самченко, С.С. Киселев, М.С. Кондратьев, В.М. Комаров
Об особенностях механизма точечных спонтанных мутаций в структуре Y-хромосомы человека 568

А.Е. Семина, А.Э. Сидорова, Н.Т. Левашова
Модель урбоэкосистем как процесс автоволновой самоорганизации 574

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА И БИОФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

В.В. Внуков, И.В. Кролевец, С.Б. Панина, Н.П. Милютина, А.А. Плотников, М.А. Забродин
Регуляция свободнорадикального окисления в крови и синовиальной жидкости при посттравматическом гонартрозе 579

Е.М. Бакурова
Особенности генерации 2-дезокси-d-рибозо-1-фосфата опухолью, связь с продукцией активных форм кислорода 584

Е.А. Генералов, Л.В. Яковенко
Биологические эффекты сигналинга полисахаридов 588

Д.В. Григорьева, М.С. Терехова, Е.В. Шамова, Н.А. Ефремов, Е.В. Малюшкова, И.В. Семак, С.Н. Черенкевич, А.В. Соколов, О.М. Панасенко, И.В. Горудко
Праймирующее действие рекомбинантного лактоферрина человека на активность нейтрофилов 598

И.В. Ковалев, Ю.Г. Бирулина, С.В. Гусакова, Л.В. Смаглий, И.В. Петрова, А.В. Носарев, М.А. Медведев, С.Н. Орлов
Механизмы влияния газотрансмиттеров на процессы регуляции электрических и сократительных свойств гладких мышц 606

В.Е. Луценко, Д.В. Григорьева, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко, А.В. Соколов, И.В. Горудко
Флуоресцентный метод оценки функциональной активности нейтрофилов 612

Е.А. Рогожин
Пептидные антибиотики – структурные особенности и закономерности биологической активности 619

Е.С. Синицына, В.А. Коржиков-Влах, В.Г. Беспалов, Т.Б. Тенникова
Биодеградируемые наночастицы на основе алифатических сложных полиэфиров в качестве систем доставки лекарств 622

А.Б. Боровков, И.Н. Гудвилович
Особенности накопления и соотношения пигментов в культуре *Dunaliella salina* Teod. при различной поверхностной освещённости 626

В.А. Волков, Ю.С. Ли, М.В. Воронков, Г.П. Лапина, А.Ю. Завьялов, В.М. Мисин
Сравнительный анализ антирадикальных свойств и других физико-химических характеристик промышленных образцов воднопропиленгликолевых экстрактов лекарственных растений 630

А.Ю. Джужа, М.В. Волокитина, Е.Г. Коржикова-Влах, Т.Б. Тенникова
Монолитные молекулярно-импринтированные системы для детектирования фенилкетонурии: разработка и изучение свойств 636

Н.С. Катина, В.А. Балобанов, Н.Б. Ильина, Н.Ю. Маркелова, И.А. Кашпаров, В.В. Марченков
Структурные особенности и стабильность промежуточных состояний карбоксиангидразы 642

Н.В. Леконцева, М.С. Фандо, А.О. Михайлина, А.В. Коробейникова, А.Д. Никулин
Исследование взаимодействия РНК-шаперона proq из *Escherichia Coli* и его доменов с малой регуляторной РНК rdLD 651

В.Н. Никандров, И.А. Ильючик
Физико-химические особенности реализации протеолитических процессов клетки *Chlorella vulgaris* 654

А.Г. Соловьева, А.И. Дударь, Е.С. Голыгина
Состояние окислительного и энергетического метаболизма крови при термической травме под влиянием воздушноплазменного потока, содержащего NO 665

Е.В. Алопина, Н.А. Смирнова, О.Ю. Кузнецов
Some physicochemical properties of amino acid ionic liquids based on alkylmethylimidazolium 669

О.М. Селиванова, А.В. Глякина, М.Ю. Суворина, А.Д. Никулин, А.К. Сурин, О.В. Галзитская
Структуроно-функциональные особенности α-кристаллина 673

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОФИЗИКА

М.А. Гринберг, Е.Н. Громова, С.В. Гудков, В.А. Воденеев
Влияние хронического облучения в малых дозах на электрогенез и фотосинтетическую активность проростков гороха 680

Д.Н. Маторин, Л.Б. Братковская, А.А. Алексеев
Флуоресценция хлорофилла для оценки состояния водорослей 686

CONTENTS

Volume 3, No. 3, 2018

GENERAL BIOPHYSICS

A.M. Shakhov, A.A. Osychenko, A.A. Astafiev, G.A. Serobyan, V.A. Nadtochenko
Intracellular transport in mouse oocytes during femtosecond laser cell fusion 467

S.N. Zheleznova, R.G. Gevorgiz, A.S. Malakhov
Relationship of fukoxantine concentrations and common lipids in biomass of diatomic algae *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin 472

P.D. Kotova, D.S. Ivashin, S.S. Kolesnikov
Agonist induced Ca^{2+} signaling in mesenchymal stromal cells 476

E.V. Nemtseva, M.A. Gerasimova, O.O. Lashchuk, N.E. Karuzina, D.V. Gulnov, B.S. Melnik
Application of the time-resolved fluorescence to the characterization of proteins unfolding pathways 484

M.A. Suslov, A.V. Anisimov
Dynamics of growth and intercellular water transport in intact zea maize plants under change of the gas composition of air 489

M.S. Syrchina, A.D. Zalesskii, A.A. Osychenko, A.A. Astafiev, A.V. Aybush, V.A Nadtochenko
Investigating viscoelastic properties of mammalian oocytes nucleoplasm with optical trapping .. 495

R.A. Gus'kova, N.S. Vasil'ev, A.V. Loktyushkin, I.I. Ivanov
The effect of hydrocarbon chain length of membrane lipids, lateral pressure and cholesterol concentration on membrane oxygen permeability 499

A.V. Kostarev, V.V. Mustyatsa, A.V. Tvorogova, F.I. Ataullakhanov, N.B. Gudimchuk, I.A. Vorobiev
Fine structure and dynamics of EB3 profiles on microtubules in fibroblast cells 504

V.I. Lobyshev
Talking about the isotopic effects of heavy water in biological and model systems 511

A.P. Cherkashin, O.A. Rogachevskaya
Possible mechanisms mediating the regulation of the potential depended Ca^{2+} influx in type III taste cells 520

E.V. Malyshko, V.A. Tverdislov
Molecular machines as hierarchical chiral structures 526

A.E. Sidorova, V.A. Tverdislov
Biophysical model of self-organization of the biosphere as the hierarchy of active media 531

MODELLING IN BIOPHYCIS

P.E. Gavrilov, A.A. Kostylev, A.S. Lelekov, A.S. Malakhov
The productivity and efficiency of *Photobionts spirulina* (*Arthrospira*) platensis under different spectral composition of the led emission 535

R.P. Trenkenshu, A.S. Lelekov
The reserve and structural compounds of biomass ratio as a key parameter for the microalgae growth 541

A.A. Chekushkin, A.S. Lelekov, R.P. Trenkenshu
Automatic sensor registration circadian variation of illuminance in the Sevastopol region 547

A.S. Malakhov, R.G. Gevorgiz, S.N. Zheleznova
Modeling of light distribution on the working surface of the photobioreactor for microalgae 553

S.A. Muslov
Poisson's ratio of dentin and enamel as anisotropic media with hexagonal symmetry 561

A.A. Samchenko, S.S. Kiselev, M.S. Kondratyev, V.M. Komarov
On the peculiarities of the mechanism of point spontaneous mutations in human Y-chromosome structure 568

A.E. Semina, A.E. Sidorova, N.T. Levashova
Model of ubo-ecosystems as a process automobile self-organization 574

MEDICAL BIOPHYSICS AND BIOPHYSICAL CHEMISTRY

V.V. Vnukov, I.V. Krolevets, S.B. Panina, N.P. Milyutina, A.A. Plotnikov, M.A. Zabrodin
The regulation of free radical oxidation in blood and synovial fluid in posttraumatic gonarthrosis 579

E.M. Bakurova
The features of tumoral 2-deoxy-d-ribose-1-phosphate generation, association with production of reactive oxygen species 584

E.A. Generalov, L.V. Yakovenko
Biological effects of polysaccharides signaling 588

D.V. Grigorieva, M.S. Terekhova, E.V. Shamova, N.A. Efremov, E.V. Malyushkova, I.V. Semak, S.N. Cherenkevich, A.V. Sokolov, O.M. Panasenko, I.V. Gorudko
Priming effect of recombinant human lactoferrin on the neutrophil activity 598

I.V. Kovalev, Yu.G. Birulina, S.V. Gusakova, L.V. Smagliy, I.V. Petrova, A.V. Nosarev, M.A. Medvedev, S.N. Orlov
Mechanisms of the action of gasotransmitters on the processes of regulation of the electrical and contractile activity of smooth muscles 606

V.E. Lutsenko, D.V. Grigorieva, S.N. Cherenkevich, O.M. Panasenko, A.V. Sokolov, I.V. Gorudko
Fluorescent method for estiment neutrophils functional activity 612

E.A. Rogozhin
Peptide antibiotics – structural features and regularities of biological activity 619

E.S. Sinitsyna, V.A. Korzhikov-Vlakh, V.G. Bespalov, T.B. Tennikova
Biodegradable nanoparticles based on aliphatic polyester as drug delivery system 622

A.B. Borovkov, I.N. Gudvilovich
Speciality of pigments accumulation and its ratio in *Dunaliella salina* Teod. culture under different surface irradiance 626

V.A. Volkov, Yu.S. Li, M.V. Voronkov, G.P. Lapina, A.Yu. Zavyalov, V.M. Misin
Comparative analysis of antiradical properties and other physico-chemical characteristics of industrial samples of water-propylene glycol etracts of medicinal plants 630

A.U. Dzhuzha, M.V. Volokitina, E.G. Korzhikova-Vlakh, T.B. Tennikova
Monolithic molecularly imprinted systems for the detection of phenylketonuria: development and study of the properties 636

N.S. Katina, V.A. Balobanov, N.B. Ilyina, N.Y. Markelova, I.A. Kashparov, V.V. Marchenkov
Structural features and stability of carbonic anhydrase intermediate states 642

N.V. Lekontseva, M.S. Fando, A.O. Mikhailina, A.V. Korobeinikova, A.D. Nikulin
Investigation of RNA-protein interaction between sRNA rdlD and the *Escherichia Coli* RNA chaperone proq as well as its isolated domains 651

V.N. Nikandrov, I.A. Ilyuchyk
Physico-chemical features of proteolytic processes realization of *Chlorella vulgaris* cell 654

A.G. Soloveva, A.I. Dudar, E.S. Golgina
State of oxidative and energy metabolism of the blood in thermal injury under the influence of air-plasma flow containing NO 665

E.V. Alopina, N.A. Smirnova, O.Yu. Kuznetsov
Some physicochemical properties of amino acid ionic liquids based on alkylmethylimidazolium 669

O.M. Selivanova, A.V. Glyakina, M.Yu. Suvorina, A.D. Nikulin, A.K. Surin, O.V. Galzitskaya
Structural and functional peculiarities of α-crystallin 673

ECOLOGICAL BIOPHYSICS

M.A. Grinberg, E.N. Gromova, S.V. Gudkov, V.A. Vodeneev
Effects of chronic irradiation in low doses on electrogenesis and photosynthetic activity of pea seedlings 680

D.N. Matorin, L.B. Bratkovskaja, A.A. Alekseev
Fluorescence of chlorophyll for assessing the state of algae 686

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ В ООЦИТАХ МЫШИ ПРИ СЛИЯНИИ ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ

Шахов А.М., Осыченко А.А., Астафьев А.А., Серобян Г.А., Надточенко В.А.
Институт химической физики им. Н.Н. Семенова (ИХФ РАН)
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: physics2007@yandex.ru
Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. В работе представлены результаты по отслеживанию внутриклеточного транспорта в клетках млекопитающих во время искусственного слияния. В качестве модельного объекта были использованы ооциты мыши, которые подвергались процедуре лазерного слияния. Воздействие фемтосекундными лазерными импульсами в месте контакта двух ооцитов приводило к перфорации и объединению мембран и медленному изменению формы слитого ооцита с эллипсоидной на сферическую. В результате слияния происходил сложный процесс перемешивания цитоплазмы исходных ооцитов, задействующий механизмы внутриклеточного транспорта и активной диффузии. Для визуализации данных механизмов были применены методы флуоресцентной микроскопии основанные на GFP и BODIPY. Установлено, что мелкие частицы в цитозоле ооцитов перемешивается преимущественно диффузионно, в то время как органеллы и цитоскелет, не способные к диффузионному транспорту, не перемешиваются после окончания слияния в течении нескольких часов.
Ключевые слова: *ооциты мыши, лазерное слияние клеток, фемтосекундные лазеры, GFP, BODIPY.*

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное слияние клеток является широко применяемым подходом к изучению живых клеток, и позволяет получать уникальные знания о внутриклеточных процессах и клеточном цикле. Метод слияния клеток важен для фундаментальных исследований и биотехнологий в целом, он позволяет осуществлять как перенос генов, так и генетическую терапию, а также создание гибридных клеточных линий и репрограммирование клеток, производить клонирование и тетраплоидизацию [1].

На данный момент доступно множество методик искусственного слияния, которые включают в себя лазерное слияние [2-4], электрослияние [5, 6], применение осмотических агентов [7] и вирусов [8]. Среди других методов лазерное слияние клеток с использованием фемтосекундных световых импульсов с длиной волны, лежащей в ближнем инфракрасном диапазоне и попадающей в так называемое окно прозрачности ткани (700-1000 нм) [9], является минимально инвазивным и прецизионным методом [10]. Фемтосекундные лазерные импульсы локально воздействуют в месте контакта двух сливаемых клеток. Сверхмалая длительность и высокая пиковая интенсивность таких лазерных импульсов вызывает многофотонное поглощение в заданной области, за счет чего с субдифракционным разрешением [11] происходит перфорация липидного бислоя клеток и их объединение. За слиянием цитоплазматической мембраны непосредственно активируется процесс объединения цитоплазмы сливаемых клеток.

Все клетки эукариот включают в себя ядро с генетической информацией и цитоплазму, состоящую из органелл, различных везикул с веществами, цитоскелета и цитозоля. Известно, что транспорт крупных частиц внутри клетки (*i.a.* белков) происходит в везикулах, к которым крепятся специальные моторные белки двигающие контейнеры с липидной мембраной по микротрубочкам и актиновым филаментам в клетке [12]. Однако, более мелкие частицы, включающие в себя питательные вещества и некоторые белковые комплексы, могут передвигаться внутри клетки диффузионно или за счет так называемой активной внутриклеточной диффузии [13]. Одной из таких частиц, которая транспортируется во все части живых клеток, является зеленый флуоресцентный белок – GFP, повсеместно используемый во флуоресцентной микроскопии [14]. В то же время распределение везикул с ферментами, кофакторами и некоторыми белками с большим содержанием тиолов [15] внутри клетки легко детектируется с помощью специфичного на тиолы красителя BODIPY. В результате различные механизмы внутриклеточного транспорта, которые происходят после начала слияния клеток, можно визуализировать с помощью GFP и BODIPY красителей.

Таким образом, в данной работе исследуются процессы транспорта вещества и органелл внутри сливаемых клеток при лазерном слиянии ооцитов мыши. Для слияния используются фемтосекундные лазерные импульсы, а для визуализации внутриклеточного транспорта используются GFP и подкрашенные BODIPY ооциты мыши на стадии MII. Экспериментальные данные по флуоресценции красителей показывают, что GFP, отображающий преимущественно распределение мелких частиц внутри ооцита, перераспределяется с большой скоростью между двумя сливающимися ооцитами по диффузионному механизму. С другой стороны, подкрашенные BODIPY части цитоплазмы, отображающие распределение органелл, везикул и крупных частиц цитоплазмы, привязанных к цитоскелету, практически не перераспределяются после слияния, демонстрируя неравномерность флуоресценции даже после нескольких часов от момента слияния ооцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась линия мышей C57BL/6 (без GFP), а также линия трансгенных GFP мышей C57BL/6-Tgn(ACTbEGFP)10sbJ в возрасте 6-8 недель. Мыши стимулировались для суперовуляции стандартным методом внутрибрюшной инъекции 10 МЕ фолликулостимулирующего гормона с последующей инъекцией 10 МЕ хорионического гонадотропина через 48 часов после первой.

Для проведения процедуры лазерного слияния ооциты мыши очищали от блестящей оболочки и попарно склеивали в отдельной лунке в течение 15 минут с помощью лектина (L8902, Sigma), где в каждой паре был GFP-положительный и GFP-отрицательный ооцит. В случае подкраски BODIPY 493/503 склеивался один окрашенный и один неокрашенный ооцит линии C57BL/6. При этом для подкраски BODIPY (B2103, Invitrogen) ооциты предварительно помещались в краситель (3 мкг/мл) на 15 минут.

Возбуждение флуоресценции производилось на длине волны 462 нм с помощью лазерного диода (Nichia NDB7675), излучение которого заводилось в боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX71 и фокусировалось объективом 40x, 0,75 NA на образец. Образец представлял собой 35 мм пластиковую чашу петри с покровным стеклом в центре, на котором в капле PBS под маслом находились попарно склеенные ооциты. Изображения в видимом свете и флуоресценция регистрировались с помощью ПЗС камеры Ximea xiD MD061CU-SY.

Для лазерного слияния ооцитов использовались цуги лазерных импульсов из Ti:Sapphire осциллятора (Tsunami, Spectra-Physics) на длине волны 790 нм, имеющие длительность 30 фс и частоту повторения 80 МГц. Длительность цуга регулировалась с помощью механического затвора и составляла 15 мс (~10^6 импульсов в цуге), при этом энергия в лазерном импульсе точно подстраивалась с помощью поляризационного аттенюатора и составляла 1,5 нДж. Далее лазерное излучение заводилось в микроскоп и фокусировалось объективом (40x, 0,75 NA) в ооцит. Место попадания лазера в контакт мембран ооцитов точно подстраивалось с помощью 3-координатной пьезоплатформы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения перераспределения мелких частиц в цитоплазме во время лазерного слияния была разработана модельная система, которая включала GFP-положительный (+) и GFP-отрицательный (-) ооциты на стадии MII, очищенные от блестящей оболочки и приклеенные друг к другу лектином. Цуг фемтосекундных импульсов попадал точно в место контакта двух ооцитов, после чего происходила локальная перфорация мембраны обоих ооцитов, и возникал расширяющийся канал, через который было возможно перетекание цитоплазмы. В первом случае канал со временем расширялся, а центры исходных ооцитов сближались, что приводило к образованию сначала объединенного ооцита эллипсовидной формы, и, далее, ооцита сферической формы. Во втором случае происходила перфорация мембраны, которая не приводила к слиянию ооцитов и изменению их формы, однако позволяла веществу перетекать. В обоих случаях на временном масштабе в несколько минут происходило перераспределение флуоресцентного белка GFP между GFP(+) и GFP(-) ооцитами. На рисунке 1 представлены изображения ооцитов при слиянии и видно, что перетекание GFP происходит за достаточно малое время. Интенсивности свечения ооцитов уравнивались в обоих случаях за время порядка 5-10 мин, при этом время было тем меньше чем быстрее потом сливались исходные ооциты. Максимальное время наблюдалось при частичной

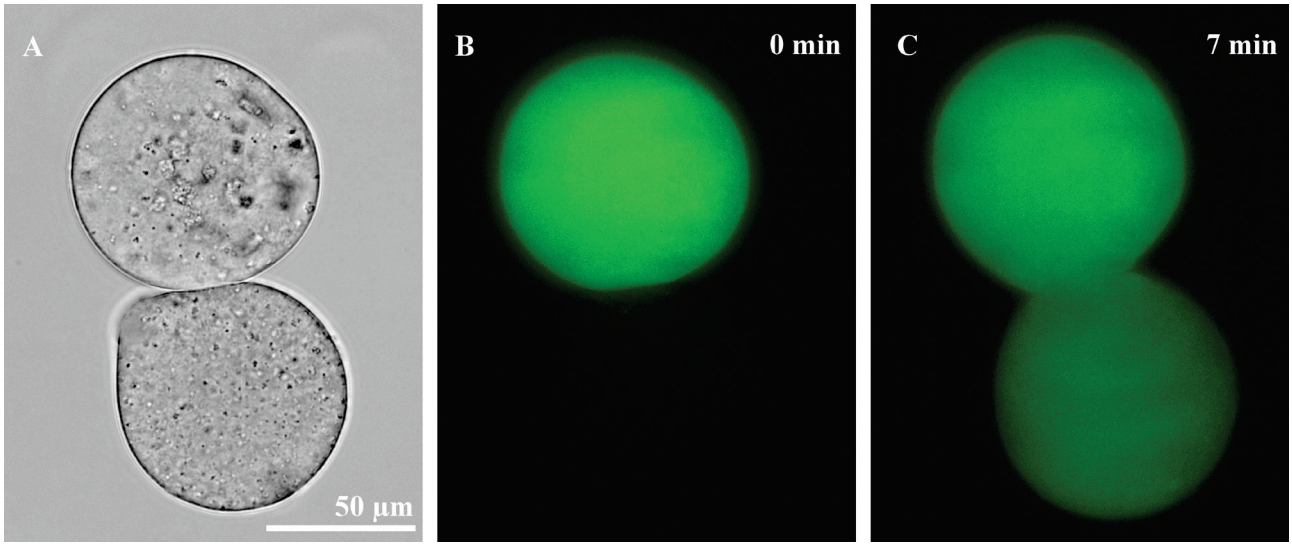


Рисунок 1. Перераспределение материала, подкрашенного с помощью GFP, во время лазерного слияния. A – в изображение исходных ооцитов, GFP(+) – верхний, а GFP(-) – нижний ооцит. B – флуоресценция ооцитов до слияния, зеленым светом светится только GFP(+) ооцит. C – свечение ооцитов через 7 минут после слияния

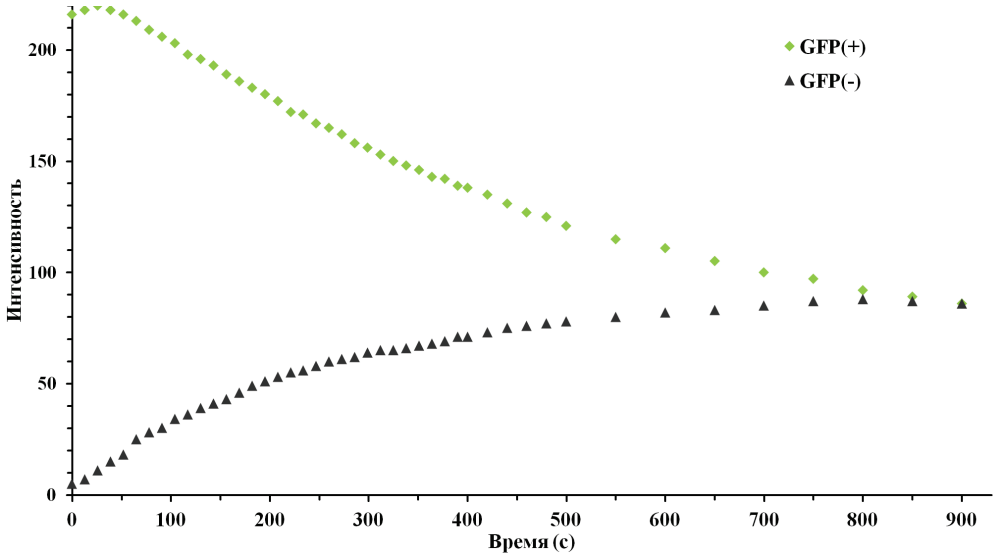


Рисунок 2. График изменения интенсивности флуоресценции GFP(+) и GFP(-) ооцитов после перфорации цитоплазматической мембраны и начала внутриклеточного транспорта GFP

перфорации мембраны, когда исходные ооциты не сливались, но происходил обмен компонентами цитозоля. Окончательное слияние в первой группе, как правило, происходило за 1 ч.

На рисунке 2 приведен график изменения интенсивности свечения GFP(+) и GFP(-) ооцитов после перфорации мембраны. Видно, что нарастание флуоресценции в GFP(-) ооците происходит сразу после перфорации мембраны и постепенно замедляется, с другой стороны свечение GFP(+) ооцита спадает достаточно быстро, что вызвано не только перетеканием цитозоля, но и выцветанием GFP. Из полученных данных о скорости перераспределения GFP можно сделать вывод, что при перфорации мембраны начинается интенсивный обмен мелкими частицами в цитозоле ооцитов, который идет по диффузионному механизму.

Другая часть работы включала эксперименты с модельной системой, состоящей из двух склеенных лектином ооцитов GFP(-) (то есть без GFP гена), один из которых предварительно подкрашивался с помощью специфичного на тиолы красителя BODIPY 493/503. Использование этого красителя позволяло детектировать различные белки, ферменты и кофакторы преимущественно находящиеся в активном состоянии и встроенные в крупные органеллы ооцита. Таким образом, подкраска BODIPY фактически позволяла отслеживать передвижение крупных частиц, прикрепленных к цитоскелету, между слитыми клетками. Краситель BODIPY 493/503 был выбран благодаря его малому стоксовому сдвигу, высокому квантовому выходу, низкому выцветанию и яркой флуоресценции в зеленой области спектра.

При лазерном слиянии ооцитов так же было два случая: в первом происходила перфорация мембраны и, далее, происходило полное слияние исходных ооцитов, а во втором происходила только перфорация мембраны без объединения пары клеток в одну. В обоих случаях, в отличие от эксперимента с GFP ооцитами, наблюдалось отсутствие обмена подкрашенным веществом между клетками. Как видно из рисунка 3 даже при полном слиянии двух ооцитов не наблюдалось перемешивания цитоплазмы подкрашенного и не подкрашенного ооцита – на

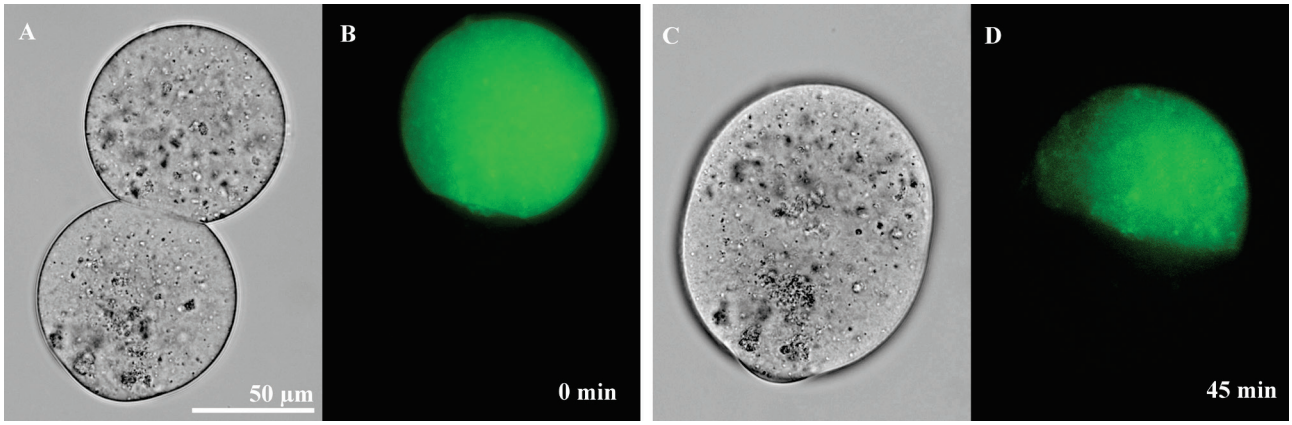


Рисунок 3. Перераспределение материала, подкрашенного с помощью BODIPY, во время лазерного слияния. A – в изображение исходных ооцитов: только верхний ооцит подкрашен BODIPY; B – флуоресценция ооцитов до слияния, зеленым светом светится только окрашенный BODIPY ооцит; C – форма слитого ооцита через 1 ч после перфорации цитоплазматической мембраны фемтосекундным лазером; D – флуоресценция слитого ооцита, отображающая распределение органелл и везикул через 45 мин после слияния

флуоресцентном изображении регистрировалась светящаяся полусфера (рис. 3D). Из полученных данных по распределению флуоресценции тиолов после лазерного слияния можно сделать вывод, что органеллы и везикулы, которые двигаются за счет специальных моторных белков, и цитоскелет ооцитов не подвержен перемешиванию при слиянии.

Таким образом, эксперимент с GFP(+) и GFP(-) ооцитами показал, что при лазерном слиянии происходит перемешивание мелких частиц в цитоплазме и цитозоля между ооцитами, причем на временах соответствующих скорости диффузионного транспорта. С другой стороны белки, ферменты и кофакторы, задействованные в электрон-транспортных цепях и окислительном фосфорилировании и связанные с крупными органеллами клетки не перераспределяются даже за времена в несколько часов, что говорит об устойчивости цитоскелета клеток после слияния и отсутствии транспорта органелл.

В итоге установлено, что при слиянии ооцитов цитоскелет исходных клеток практически не претерпевает изменений и происходит только диффузионный обмен мелкими частицами в цитоплазме ооцитов.

Работа частично выполнена за счет субсидии, выделенной ИХФ РАН на выполнение государственного задания, тема 0082-2018-0005 (код АААА–А18–118020690203–8) в части лазерного слияния клеток, с использованием оборудования ЦКП ИХФ РАН № 506694. Работа по исследованию внутриклеточного транспорта с помощью GFP белков выполнена за счет гранта РФФИ 17-00-00403, а работа с использованием красителя BODIPY поддержана за счет средств гранта РФФИ 16-53-52046.

Список литературы / References:

1. Alvarez-Dolado M. Cell Fusion: Biological Perspectives and Potential for Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioscience*, 2007, vol. 1, no. 12, pp. 1-12.

2. Karmenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A., Krivokharchenko A.S., Chiou A.E., Chailakhyan L.M. Use of Picosecond Infrared Laser for Micromanipulation of Early Mammalian Embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2009, vol. 75, pp. 975-983.

3. Krivokharchenko A.K., Sarkisov O.M., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. Laser Fusion of Mouse Embryonic Cells and Intra-Embryonic Fusion of Blastomeres without Affecting the Embryo Integrity. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 12, p. e50029.

4. Kuetemeyer K., Rezgui R., Lubatschowski H., Heisterkamp A. Mechanisms of Femtosecond Laser Cell Surgery in the Low-Density Plasma Regime. *Optical Interactions with Tissue and Cells Xxii*, 2011, vol. 7897.

5. Popova E., Krivokharchenko A. Effects of Electric Field on Early Preimplantation Development in Vitro in Mice and Rats. *Human Reproduction*, 2011, vol. 26, no. 3, pp. 662-670.

6. Rems L., Ušaj M., Kandušer M., Reberšek M., Miklavčič D.,Pucihar G. Cell Electrofusion Using Nanosecond Electric Pulses. *Scientific Reports*, 2013, vol. 3, p. 3382.

7. Pontecorvo G., Hales A. Time and Mode of Fusion of Human Fibroblasts Treated with Polyethylene Glycol (Peg) *Nature*, 1997, vol. 265, pp. 257-258.

8. Gottesman A., Milazzo J., Lazebnik Y. V-Fusion: A Convenient, Nontoxic Method for Cell Fusion. *Biotechniques*, 2010, vol. 49, no. 4, pp. 747-750.

9. Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. Bioimaging: Second Window for in Vivo Imaging. *Nat Nano*, 2009, vol. 4, no. 11, pp. 710-711.

10. Osychenko A.A., Tochilo U.A., Astafiev A.A., Zalessky A.D., Shakhov A.M., Krivokharchenko A.S., Nadtochenko V.A. Determining the Range of Noninvasive near-Infrared Femtosecond Laser Pulses for Mammalian Oocyte Nanosurgery. *Sovremennye tehnologii v medicine,* 2017, vol. 9, no. 1, pp. 21-27.

11. Astaf'ev A.A., Zalesskii A.D., Shakhov A.M., Osychenko A.A., Nadtochenko V.A. Formation of Light-Absorbing Centers Induced in Cytoplasm of Mouse Embryos by Femtosecond Pulsed near-Infrared Radiation. *High Energy Chemistry*, 2016, vol. 50, no. 5, pp. 421-423.

12. Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y., Niwa S. Kinesin Superfamily Motor Proteins and Intracellular Transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology,* 2009, vol. 10, p. 682.

13. Brangwynne C.P., Koenderink G.H., MacKintosh F.C., Weitz D.A. Intracellular Transport by Active Diffusion. *Trends in Cell Biology,* 2009, vol. 19, no. 9, pp. 423-427.

14. Visser A.J.W.G., Westphal A.H., Skakun V.V., Borst J.W. Gfp as Potential Cellular Viscosimeter. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016, vol. 4, no. 3, p. 035002.

15. Brandes N., Schmitt S., Jakob U. Thiol-Based Redox Switches in Eukaryotic Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, vol. 11, no. 5, pp. 997-1014.

INTRACELLULAR TRANSPORT IN MOUSE OOCYTES DURING FEMTOSECOND LASER CELL FUSION

Shakhov A.M., Osychenko A.A., Astafiev A.A., Serobyan G.A., Nadtochenko V.A.
Semenov Institute of Chemical Physics (ICP RAS)
Kosygina st., 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: physics2007@yandex.ru

Abstract. Here we demonstrate intracellular transport in fused mammalian cells. Mouse oocytes as a model system were subjected to the laser cell fusion. The contact point of the two oocytes cytoplasmic membranes was exposed to femtosecond laser pulses, which produce the membrane perforation and fusion and a slow change in the shape of the fused oocyte from ellipsoidal to spherical. A complex process of original oocytes cytoplasm mixing took place as a result of the fusion, involving mechanisms of intracellular transport and active diffusion. Fluorescence microscopy methods based on GFP and BODIPY staining were applied to visualize these mechanisms. We revealed that the small particles in cytosol of the oocytes are mixed almost diffusively, while the organelles and cytoskeleton, that are incapable of diffusion, are not mixed even within several hours after the very end of the oocyte fusion.

Key words: *mouse oocytes, laser cell fusion, femtosecond laser, GFP, BODIPY.*

ВЗАИМОСВЯЗЬ КОНЦЕНТРАЦИЙ ФУКОКСАНТИНА И ОБЩИХ ЛИПИДОВ В БИОМАССЕ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN

Железнова С.Н.[1], Геворгиз Р.Г.[1], Малахов А.С.[2]

[1] ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского,
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ
[2] Национальный исследовательский Томский политехнический университет
пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin способна синтезировать целый ряд биологически активных веществ: каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), витамины и т.д. Среди всех каротиноидов наибольший интерес представляет фукоксантин (Фк), который по нашим данным в клетках *C. closterium* накапливается до 2,3% от сухой массы. Таким образом диатомовую водоросль *C. closterium* целесообразно выращивать в промышленных масштабах с целью получения фукоксантина и липидов. Для подбора оптимальный условий синтеза липидов в промышленных условиях культивирования возникла необходимость в разработке экспресс - метода определения липидов в биомассе диатомовых. Цель: экспериментально определить взаимосвязь между концентрациями фукоксантина и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin при различных условиях культивирования. Нами была обнаружена линейная зависимость накопления фукоксантина и общих липидов в клетках диатомовой водоросли *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования. На основе данной зависимости можно разработать экспресс-метод определения липидов в интенсивной культуре.
Ключевые слова: *диатомовые водоросли, фукоксантин, липиды.*

Диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin способна синтезировать целый ряд биологически активных веществ: каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), витамины и т. д. [1-3]. Среди всех каротиноидов наибольший интерес представляет фукоксантин (Фк) [4-6], который по нашим данным в клетках *C. closterium* накапливается до 2,3 % от сухой массы. Особый интерес представляют эйкозапентаеновая кислота и арахидоновая кислоты [3], концентрация которых в сухой биомассе по нашим данным достигает 4,3 и 1,5 % (табл. 1).

Таблица 1. Состав жирных кислот диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (в % от суммарных липидов)

Наименование жирных кислот	Доля от суммарных липидов, %	Доля в биомассе, %
Миристиновая кислота 14:0	2,87±0.90	0,52
Пальмитиновая кислота 16:0	13,72±0.10	2,47
Пальмитоолеиновая 16:1 (n-7)	17,95±0.80	3,23
Стеариновая 18:0	1,08±0.80	0,2
Олеиновая 18:1 (n-9)	17,16±10	3,1
Линолевая 18:2 (n-6)	2,20±0.10	0,4
Арахидоновая 20:4 (n-6)	8,36±0.10	1,5
Эйкозапентоеновая 20:5 (n-3)	23,91±0.50	4,3
Докозагексаеновая 22:6 (n-3)	1,26±0.10	0,2268

По литературным данным концентрация общих липидов у *C. closterium* достигает 25-27 % от сухой массы [2, 3]. В наших экспериментах общие липиды не превышали 21 %. Поскольку практически все биологически активные вещества *C. closterium* жирорастворимы можно предположить, что будет наблюдаться взаимосвязь между долей общих липидов и биологически активных веществ.

Цель: экспериментально определить взаимосвязь между концентрациями фукоксантина и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin при различных условиях накопительного и проточного культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследовали диатомовую водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. Культуру адаптировали к концентрированным минеральным питательным средам. После адаптации культуру использовали в качестве инокулята для накопительного и проточного культивирования.

В интенсивной культуре как в накопительной, так и в проточной плотность культуры определяли методом йодатной окисляемости [7] и прямым взвешиванием сырой массы *C. closterium* после осаждения клеток центрифугированием при 1600g в полипропиленовых центрифужных пробирках.

Содержание общих липидов определяли сульфофосфованилиновым методом [8]. Липиды экстрагировали дважды из сырой биомассы (навеска 0,04 г) смесью Фолча. Затем несколько раз промывали дистиллированной водой и переносили в сухие пробирки. Аликвоту 0,1-0,2 мл упаривали и добавляли по 0,5 мл серной кислоты. Удерживали на кипящей бане в течении 10-15 мин. После кипячения к пробам добавляли 2,5 мл фосфованилинового реактива и оставляли в темном месте на 40 мин для развития окраски. Затем определяли оптическую плотность на длине волны 530 нм. Содержание липидов в аликвотах рассчитывают по калибровочному графику. Все расчеты содержания липидов вели на общий объём экстрагированных из биомассы липидов.

Фукоксантин в биомассе *C. closterium* определяли методом тонкослойной хроматографии (ТХС) с использование ранее охарактеризованного стандарта методами UV-VIS, HPLC, масс- и ЯМР спектроскопии. Предварительно отбирали 10 мл культуры из экспериментального фитобиореактора, центрифугировали при 3000 об/мин (1600g), надосадочную жидкость удаляли. Из полученной массы водорослей фукоксантин экстрагировали спиртом. Экстракцию проводили два-три раза до полного обесцвечивания биомассы. Спиртовые экстракты объединяли. Для количественного определения Фк в суммарном спиртовом экстракте отбирали аликвоту 0,1 мл с помощью дозатора из суммарного спиртового экстракта и наносили её на хроматографические стеклянные пластинки, с закрепленным слоем силикагеля толщиной 0,5 мм. Процесс разделения каротиноидов методом ТСХ проводили в системе ацетон–гексан в соотношении 3:7. Фракцию силикагеля, содержащую Фк, несколько раз элюировали (экстрагировали) спиртом до полного обесцвечивания силикагеля с последующим центрифугированием. Концентрацию Фк в аликвоте ($Fc_{ал}$) определяли на спектрофотометре СФ-2000 на длине волны 442 нм по формуле:

$$Fc_{ал.} = \frac{10 * D_{442} * V_{эл}}{E}, \text{ мг/мл}$$

где $V_{эл}$ – объём объединенного элюента с пластины, мл; D_{442} – оптическая плотность на длине волны 442 нм; $E^{\%}_{1}$ см = 1280 м$^{-1}$ – коэффициент экстинкции фукоксантина в 96 % этаноле [9].

Концентрацию Фк в суммарном спиртовом экстракте (Fc) пересчитывали на сухую массу микроводоросли (Fc) по следующим формуле:

$$Fc = (Fc_{ал} \cdot V_{ал.} \cdot V_{выт.}) / B, \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1},$$

где Fc – концентрация фукоксантина в навеске; $Fc_{ал}$ – концентрация фукоксантина в аликвоте, которую нанесли на хроматографическую пластинку; $V_{ал}$ – объём аликвоты, нанесенной на пластину, мл; $V_{выт}$ – объём общей спиртовой вытяжки, полученной в результате многократной экстракции навески сырой биомассы *C. closterium*, мл; B – масса навески водоросли, г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

На рисунке 1 представлена обнаруженная нами зависимость накопления фукоксантина и общих липидов в клетках диатомовой водоросли *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования. В диапазоне от 0 до 10 мг·г$^{-1}$ содержания Фк наблюдается линейная зависимость с углом наклона равным 2,28. Затем идет насыщение – концентрация Фк увеличивается, а содержание липидов остается неизменным. Возможно, прямолинейную зависимость между концентрациями Фк и общих липидов до определенного значения Фк в культуре можно объяснить тем, что и Фк, и липиды являются структурными компонентами пластид [10] и синтез липидов в основном идет по прокариотическому пути метаболизма, а не по эукариотическому пути (все жирные кислоты накапливаются в пластидах) [11]. В условиях лимитирования роста биогенными элементами фотосинтетические мембраны, включающие липиды и Фк активно синтезируются для защиты фотосинтетического аппарата от повреждающего действия света, причем доля липидов и Фк остается неизменной. При накоплении липидов до 21 % синтез липидов приостанавливается, а накопление Фк продолжается до 23 мг·г$^{-1}$. Принято считать, что Фк локализован в фотосинтеической мембране и выполняет защитную функцию. Согласованный синтез фотосинтетических липидсодержащих структур при малом содержании Фк (до 10 мг·г$^{-1}$) в клетках, по-видимому, это подтверждает. Не ясным остается вопрос о локализации Фк в клетках, когда его концентрация достигает 23 мг·г$^{-1}$.

Отметим, возможно, прямолинейная зависимость между концентрациями Фк и общих липидов характерна для всех диатомей, но для каждого вида диатомовых водорослей коэффициент перехода будет индивидуальный.

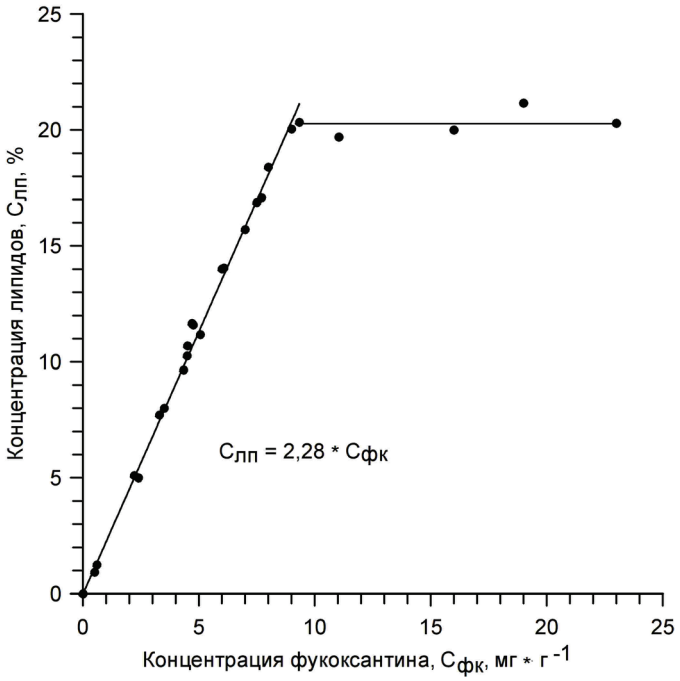


Рисунок 1. Зависимость концентраций Фк и общих липидов в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin

Полученная линейная зависимость имеет большое практическое значение, поскольку позволяет исключить трудоёмкое определение общих липидов при исследовании культур диатомей. Зная концентрацию Фк у *C. closterium,* можно определить концентрацию липидов по уравнению:

$$C_{лп} = K * C_{Фк},$$

где $C_{лп}$ – концентрация липидов, %; $C_{фк}$ – концентрация фукоксантина, мг·г$^{-1}$; К = 2,28 – коэффициент перехода от концентрации Фк к концентрации общих липидов для диатомовой водоросли *C. closterium*.

Также отметим, что обнаруженную нами линейную зависимость можно использовать для разработки экспресс-метода определения общих липидов по оптической плотности культуры *C. closterium* или ее экстрактов, т.к. по нашим данным концентрация Фк и оптическая плотность также связаны функциональной зависимостью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружена линейная зависимость накопления фукоксантина (до 10 мг·г$^{-1}$) и общих липидов в культуре *C. closterium* при различных условиях проточного и накопительного культивирования. На основе данной зависимости можно разработать экспресс-метод определения липидов в интенсивной культуре.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИМБИ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ госрегистрации АААА-А18-118021350003-6) и при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00672.

Список литературы / References:

1. D'Orazio N., Gemello E., Gammone M.A., de Girolam M., Ficoneri C., Riccioni G. Fucoxantin: A Treasure from the Sea. *Marine Drugs,* 2012, vol. 10, pp. 604-616.

2. Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroil J.-M., Jeffrey S.W. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, 1994, vol. 35, pp. 155-161.

3. Suman K., Kiran T., Devi U.K., Sarma N.S. Culture medium optimization and lipid profiling of *Cylindrotheca*, a lipid- and polyunsaturated fatty acid-rich pennate diatom and potential source of eicosapentaenoic acid. *Botanica Marina*, 2012, vol. 55, pp. 289-299.

4. Affan A., Heo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium*. *Journal of Phycology*, 2009, vol. 45, pp. 1405-1415.

5. Kumar S.R., Hosokawa M., Miyashita K. Fucoxanthin: a marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine Drugs,* 2013, vol. 11, pp. 5130-5147.

6. Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Murakami-Funayama K., Miyashita K. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports*, 2009, vol. 2, iss. 6. pp. 897-902.

7. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Никонова Л.Л., Бобко Н.И., Нехорошев М.В. *Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости*. Севастополь, 2015, 31 с. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Nikonova L.L., Bobko N.I., Nekhoroshev M.V. *Estimation of the density of culture of phototrophic microorganisms by the iodate oxidation method*. Sevastopol, 2015, 31 p. (In Russ.)]

8. *Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры*. Ред. А.И. Агатова. Москва: изд-во ВНИРО, 2004, 123 с. [*A guide on modern biochemical methods for studying aquatic ecosystems that are promising for fishing and mariculture*. Ed. A.I. Agatova. Moscow: publishing house VNIRO, 2004, 123 p. (In Russ.)]

9. Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S.K., Mizuno M., Yoshimura K., Maoka T., Kanazawa K. The distribution and accumulation of fucoxanthin and its metabolites after oral administration in mice. *British Journal of Nutrition.*, 2009, vol. 102, pp. 242-248.

10. Тренкеншу Р.П. Динамическая модель биотрансформации резервных и структурных форм биомассы микроводорослей в темноте. *Вопросы современной альгологии*, 2016, № 2 (12), URL: http://algology.ru/967. [Trenkenshu R.P. Dynamic model of biotransformation of reserve and structural forms of microalgae biomass in the dark. *Voprosy sovremennoy al'gologii ,* 2016, no. 2 (12), URL: http://algology.ru/967. (In Russ.)]

11. Pratiwi A.R., Syah D., Hardjito L., Panggabean L.M.G., Suhartono M.T. Fatty Acid Synthesis by Indonesian Marine Diatom, *Chaetoceros gracilis. Hayati Journal of Biosciences,* 2009, vol. 16, iss. 4, pp. 151-156.

RELATIONSHIP OF FUKOXANTINE CONCENTRATIONS AND COMMON LIPIDS IN BIOMASS OF DIATOMIC ALGAE CYLINDROTHECA CLOSTERIUM (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN

Zheleznova S.N.[1], Gevorgiz R.G.[1], Malakhov A.S.[2]

[1] Institute of Marine Biological Research A.O. Kovalevsky

Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

[2] National Research Tomsk Polytechnic University

Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Abstract. Diatoms *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin is able to synthesize biologically active substances: carotenoids, polyunsaturated fatty acids (PUFAs), vitamins, and others. Among all carotenoids, fucoxanthin (Fc) is the most important, which according to our data in *C. closterium* cells accumulates up to 2.3% of the dry mass. Thus *C. closterium* is advisable to grow on an industrial scale in order to obtain fucoxanthin and lipids (PUFA). For the selection of optimal conditions for the synthesis of lipids under industrial cultivation conditions, there was a need to develop an express method for determining lipids in biomass diatoms. Objective: to experimentally determine the relationship between the concentrations of fucoxanthin and total lipids in the biomass of diatom alga *C. closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin under various cultivation conditions.We found a linear relationship between the accumulation of fucoxanthin and total lipids in cells of the diatom *C. closterium* under the various conditions culture. Based on this relationship, it is possible to develop an express method for the determination of lipids.

Key words*: diatoms, fucoxanthin, lipids.*

АГОНИСТ-ИНДУЦИРУЕМАЯ Ca^{2+} СИГНАЛИЗАЦИЯ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Котова П.Д., Ивашин Д.С., Колесников С.С.

ФБГУН Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская обл., РФ; e-mail: polinakotova88@gmail.com

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) из различных источников представляют собой гетерогенную популяцию недифференцированных пролиферирующих клеток, которая содержит мультипотентные стволовые клетки, способные к дифференцировке в клетки нескольких мезенхимных линий. Используя микрофотометрию (Ca^{2+} imaging) и Ca^{2+}-чувствительный флуорофор Fluo-4, мы исследовали Ca^{2+} сигналы, инициируемые агонистами ряда GPCR рецепторов в МСК из жировой ткани человека. Интересной особенностью агонист-индуцированной Ca^{2+} сигнализации в МСК было то, что кратковременная стимуляция клеток вызывала Ca^{2+} ответы, которые генерировались по принципу "все-или-ничего". Более точно, при относительно низких дозах агонисты не вызывали детектируемого изменения внутриклеточного Ca^{2+}, но стимулировали большие Ca^{2+} ответы, которые были примерно одинаковы по амплитуде при различных концентрациях агонистов, превышающих пороговую. Последняя была оценены как 0.1, 0.5, 1 и 2 мкМ для норадреналина, ADP, ATP, и UTP, соответственно. Результаты экспериментов с использованием ингибиторного анализа и фотолиза химических групп (uncaging) свидетельствовали о том, что фосфоинозитидный каскад и Ca^{2+} индуцированный выброс депонированного Ca^{2+} (Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release (CICR)) вовлечены в формирование агонист-зависимых Ca^{2+} сигналов в цитоплазме МСК. В целом, полученные данные позволяют рассматривать трансдукцию исследовавшихся агонистов как двух-стадийный процесс. Первоначально агонист стимулирует локальный Ca^{2+} сигнал, который, скорее всего, градуально зависит от его дозы. При превышении порога этот локальный Ca^{2+} сигнал стимулирует CICR, который конвертирует его в глобальный Ca^{2+} сигнал и придает окончательную форму Ca^{2+} ответу на агонист, делая его универсальным при различных концентрациях, превышающих пороговую.

***Ключевые слова**: Ca^{2+} сигнализация, гептаспиральные рецепторы, calcium-induced calcium release, IP_3 рецепторы, мезенхимные стромальные клетки.*

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, включающую недифференцированные клетки, которые обеспечивают регенерацию поддерживающей и соединительной тканей, благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке в клетки разных линий [1-3]. В силу ряда специфических свойств МСК, поддерживаемые в культуре, вызывают особый интерес в области регенеративной медицины и иммунотерапии [4]. Несмотря на очевидный прогресс в области физиологии МСК в целом, существующие представления все еще недостаточно характеризуют рецепторные и сигнальные системы этих клеток. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, многие экстраклеточные сигнальные молекулы, включая гормоны, цитокины и нуклеотиды, способны регулировать физиологические процессы в МСК [5, 6]. Следовательно, на плазматической мембране МСК должны функционировать разнообразные рецепторные белки, сопряженные с различными внутриклеточными сигнальными каскадами, которые позволяют МСК адаптировать свои физиологические функции к изменяющемуся микроокружению.

В данной работе нами исследовались МСК из жировой ткани человека и анализировались внутриклеточные Ca^{2+} сигналы, индуцированные агонистами определенных гептаспиральных рецепторов (G-protein coupled receptors, GPCRs). По ряду причин мы фокусировались на исследовании адренергической и пуринергической систем МСК. Дело в том, что норадреналин, высвобождаемый симпатическим нервом, является важным регулятором физиологических функций жировой ткани, например, метаболизма липидов и глюкозы и секреции ряда факторов, включая адипокины и цитокины [7]. Таким образом, МСК, функционирующие в жировой ткани, должны подвергаться действию норадреналина и сигнальных молекул, высвобождаемых адипоцитами. Имеющиеся данные указывают, что пуринергические агонисты являются факторами, детерминирующими дифференцировку и миграцию МСК [5, 6, 8-10]. Повреждение биологической ткани обычно ассоциируется с существенным увеличением уровня внеклеточного ATP, который может конвертироваться внеклеточными эктонуклеотидазами в ADP, AMP и аденозин [11]. Вполне вероятно, что МСК, мигрирующие в поврежденную ткань, подвергаются воздействию нуклеотидов. Практически все эукариотические клетки экспрессируют гены пуринорецепторов, поэтому способность детектировать внеклеточные пурины и пиримидины является универсальной для различных клеточных систем [12]. Можно думать, что МСК не являются исключением. В силу сказанного, нами исследовалась Ca^{2+} сигнализация в МСК, индуцированная норадреналином, ATP, UTP и ADP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка клеток к эксперименту. МСК человека выделяли из подкожной жировой клетчатки здоровых доноров (n = 7) как описано ранее [13]. Выделенные МСК культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США) и/или в 12-луночном планшете в среде Advance Stem (HyClone) с 10 % Advance Stem Supplement (HyClone), 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. При достижении 80 % монослоя клетки пассировали. Клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и HyQTase Cell Detachment Solution (HyClone), а затем рассаживали в соотношении 1:3. В экспериментах использовали МСК 2-4 пассажей.

Перед экспериментом клетки культивировали в 12-луночный планшет в среде роста (см. выше) без антибиотика в течение 12 ч. Затем клетки двукратно промывали раствором Версена (Sigma). Для отделения от субстрата клетки инкубировали 2-3 мин в 200 мкл фермента HyQTase (HyClone). Фермент ингибировали добавлением 800 мкл полной ростовой среды, клетки ресуспендировали и помещали в пробирку для центрифугирования. Клетки концентрировали в нижней части пробирки при 50 g в течение 45 с. Клетки прикрепляли с помощью Cell Tak (BD Biosciences, США) на дно фотометрической камеры, представляющей собой покровное стекло (Menzel_Glaser, Германия) с пластиковыми бортиками, и затем загружали флуоресцентным Ca^{2+}-зондом Fluo-4. Для этого клетки инкубировали при комнатной температуре (23-25 °C) в течение 20 мин в присутствии проникающего в течение 20 мин предшественника Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0,02 %) (Molecular Probes, США). Затем клетки при 4 °C в течение 40 мин отмывали внеклеточным раствором (мМ): 110 NaCl, 5,5 KCl, 2 $CaCl_2$, 0,8 $MgSO_4$, 10 HEPES, 10 глюкоза. В экспериментах с низким содержанием Ca^{2+} 2 мМ $CaCl_2$ во внеклеточном растворе заменяли на 0,5 мМ EGTA + 0,4 мМ $CaCl_2$ (260 нМ свободного Ca^{2+}).

Микрофотометрия. Эксперименты проводились с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20x/0,75 и цифровой EMCCD камерой iXon888 (Andor Technology, США). Помимо осветителя проходящего света микроскоп был оборудован оптоволоконным осветителем для освещения через объектив. Флуоресценция клеток, нагруженных Fluo-4, возбуждалась на длине волны 480 ± 5 нм, а эмиссия регистрировалась в области 535 ± 20 нм. Последовательные изображения клеток во флуоресцентном свете регистрировались с частотой 1-2 Гц. Изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в индивидуальных клетках оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции целой клетки ($\Delta F/F_0$), где $\Delta F=F-F_0$, F – текущая флуоресценция, F_0 – флуоресценция в начале регистрации. Фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы Imaging Workbench 6 (INDEC, США).

Фотолиз химических групп (uncaging). В ряде экспериментов помимо Fluo-4 клетки загружались NP-EGTA и caged-Ins(145)P3, которые являются фотолабильным Ca^{2+} хелатором и предшественником IP_3. С этой целью клетки инкубировались в присутствии 4 мкМ Fluo-4-AM и 4 мкМ NP-EGTA-AM (Invitrogen) или 4 мкМ caged-Ins(145)P3/PM (SiChem) + 0.02 % Pluronic (Invitrogen) в течении 30 мин при 23 °C. Стимуляции фотолиза происходила на длине волны 351 нм, для чего один из входов бифуркационного оптического волокна был соединен с лазером TECH-351 Advanced (Лазер-Экспорт, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах нами использовались перфузируемые фотометрические камеры объемом ~ 150 мкл, в которые обычно помещалось порядка 10^2 МСК, нагруженных Fluo-4, что позволяло анализировать чувствительность клеток к различным соединениям методом микрофотометрии (Ca^{2+} imaging). В общей сложности нами было исследована выборка из порядка $5x10^3$ МСК, которая, как оказалось, содержала небольшие субпопуляции клеток, специфически чувствительных к норадреналину (6,7 %), ATP (12 %), ADP (7,1 %) и UTP (6 %). Это свидетельствовало о функциональной гетерогенности популяции МСК, отмечавшейся ранее [3, 13]. Между тем, для разных агонистов Ca^{2+} сигнализация, инициируемая каждым из них в цитоплазме МСК, развивалась в значительной степени идентично, что свидетельствовало о сходстве или даже идентичности механизмов, вовлеченных в сопряжение соответствующего поверхностного GPCR рецептора с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+}.

Зависимость Ca^{2+} ответов от концентрации агонистов.

В качестве одной из базовых характеристик нами анализировалась дозо-зависимость Ca^{2+} сигналов, индуцированных исследовавшимися агонистами. В соответствующих экспериментах первоначально исследовались ответы МСК на норадреналин и было установлено, что норадреналин-зависимые Ca^{2+} сигналы генерировались МСК в соответствии с принципом “все-или-ничего”. Иными словами, при концентрациях ниже 100 нМ норадреналин не вызывал детектируемых изменений уровня внутриклеточного Ca^{2+}, но выше пороговой дозы 100-200 нМ, кратковременная аппликация этого агониста инициировала импульсы Ca^{2+}, которые были в значительной степени идентичны по форме и амплитуде при различных концентрациях (рис. 1А). Поскольку кривые доза-ответ, представленные в литературе, носят градуальный характер в большинстве случаев, мы рассматривали возможность, что норадреналин вызывал слишком большие Ca^{2+} ответы, которые могли насыщать флуоресценцию Fluo-4. Это могло быть причиной того, что клеточные ответы казались примерно одинаковыми при использовавшихся дозах агониста. Однако, насыщение Ca^{2+} зонда вряд ли имело место, поскольку обработка

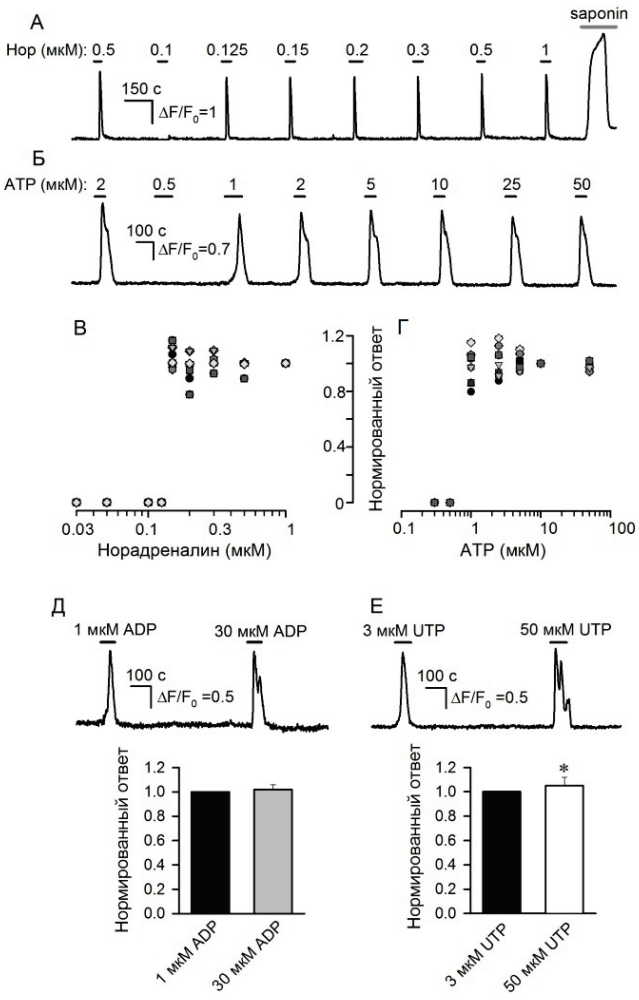


Рисунок 1. Дозозависимость Ca^{2+} ответов, инициированных агонистами

(А, Б) Репрезентативные ответы МСК на норадреналин и АТР, аппликированных при варьируемых концентрациях.

(В) Нормированные дозозависимости амплитуды ответов на норадреналин, полученные от 10 клеток. Для каждой клетки ответы на норадреналин при разных концентрациях нормировались на величину ответа на 1 мкМ норадреналина.

(Г) Нормированные дозозависимости ответов на АТР, полученные от 8 клеток. Для каждой клетки ответы на АТР нормировались на величину ответа на 10 мкМ АТР.

(Д) Репрезентативные ответы МСК на ADP при низкой и высокой концентрациях (верхняя панель) и ответы, усредненные по выборке из 16 клеток (нижняя панель).

(Е) Репрезентативные ответы МСК на UTP при низкой и высокой концентрациях (верхняя панель) и ответы, усредненные по выборке из 11 клеток (нижняя панель).

Здесь и ниже звездочка означает статистически значимые различия по отношению к контролю (Student t-test, $p<0.05$)

клеток детергентом сапонином (0.1 мг/мл), формирующим поры в наружной мембране, вызывала Ca^{2+} сигналы, которые по величине в 1,5-2 раза превышали ответы на норадреналин (17 клеток) (рис. 1А). Дальнейшие эксперименты показали, что Ca^{2+} МСК на другие тестировавшиеся агонисты также следуют принципу “все-или-ничего”. В частности, в субмикромолярных дозах АТР был неэффективен, но инициировал идентичные Ca^{2+} сигналы при концентрациях 1-2 мкМ и выше (рис. 1Б).

В случае норадреналина и АТР Ca^{2+} ответы МСК аккуратно исследованы в условиях, когда концентрация агонистов варьировалась в широком диапазоне с достаточно малым шагом (рис. 1А, Б). Поскольку рефрактерный период ответов был порядка 400 с, такие регистрации были достаточно продолжительны, и во многих клетках ответы были подвержены рандауну (rundown), который затруднял количественный анализ. В общей сложности, была найдена 21 клетка, которые достаточно стабильно отвечали на норадреналин (30 нМ – 10 мкМ) с порогом 100-200 нМ. Среди них оказалось 10 клеток, которые отвечали на норадреналин с одинаковым порогом 150 нМ и которые послужили выборкой для количественного анализа. Чтобы сравнить разные регистрации, ответы данной клетки на норадреналин при разных дозах нормировались на величину ответа на 1 мкМ норадреналин. На рисунке 1В представлены нормированные Ca^{2+} ответы на норадреналин, где разные символы соответствуют индивидуальным клеткам. Хотя имеет место определенный разброс данных, нормированные ответы локализованы в узкой области 0,8-1,2 (рис. 1В), демонстрируя, что во всех случаях кривые доза-ответ не являются градуальными, а скорее описываются зависимостью типа функции Хэвисайда, т.е. следуют принципу “все-или-ничего”. Аналогичные выводы следуют из экспериментов с АТР-чувствительными МСК, из которых 32 клетки стабильно отвечали на нуклеотид, аппликировавшийся в дозах 0,5-50 мкМ (рис. 1Б). Среди них 9 МСК генерировали идентичные Ca^{2+} сигналы при стимуляции АТР в увеличивающихся дозах при пороговой концентрации 1 мкМ (рис. 1Б, В).

В случае ADP и UTP, пороговые концентрации для этих агонистов лежали в области 0,5-2 мкМ и 3-6 мкМ, соответственно. Хотя чувствительность МСК к ADP и UTP не исследовалась столь детально, как в случае норадреналина и АТР, ряд фактов свидетельствовали о том, что кривые доза-ответ для этих нуклеотидов также подчинялись принципу “все-или-ничего”. В частности, идентичные Ca^{2+} сигналы регистрировались в МСК в ответ на ADP при концентрациях 1 и 30 мкМ (16 клеток). Тоже наблюдалось в случае UTP, аппликированного при 3 и 50 мкМ (11 клеток) (рис. 1Д, Е).

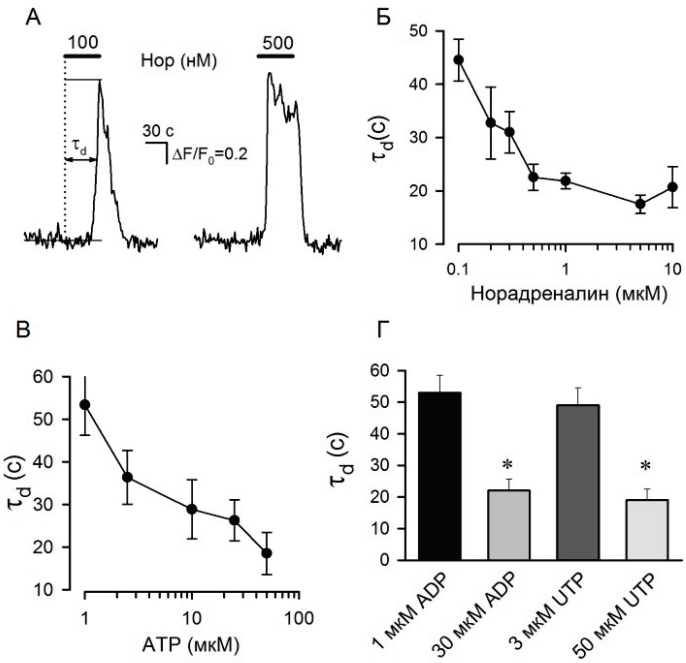


Рисунок 2. Дозозависимость лагпериода Ca^{2+} ответов на агонисты
(А) Репрезентативные Ca^{2+} сигналы в цитоплазме МСК, инициированные норадреналином при 100 нМ и 500 nM. Характерное время задержки (лагпериод) ответов (τ_d) определялось как интервал времени от момента аппликации агониста до момента достижения Ca^{2+} сигналом полу-амплитудного значения.
(Б, В) Лагпериод ответа как функция концентрации агониста. Данные получены по выборке 10 адренергических и 8 пуринергических МСК.
(Г) Лагпериод ответов МСК на ADP (n=16) и UTP (n=11).
В (Б-Г) Данные представлены как среднее ± стандартная девиация.

Еще одной примечательной особенностью ответов МСК на норадреналин и нуклеотиды было то, что индуцированные ими Ca^{2+} сигналы были заметно задержаны по отношению к моменту аппликации агонистов. Характеристическое время задержки (τ_d, рис. 2А) градуально уменьшалось по мере роста концентрации агониста, что детально исследовалось в случае норадреналина и ATP (рис. 2Б, В). В частности, было установлено, что задержка Ca^{2+} ответов, стимулируемых норадреналином, составляла 38-55 с при дозах, близких к пороговой (рис. 2А, левая панель), и сокращалась до 17-26 с при концентрации 1 мкМ и выше (рис. 2А, правая панель). Хотя для ADP и UTP этот феномен детально не исследовался, сравнительный анализ клеточных ответов демонстрирует примерно двукратное уменьшение времени задержки Ca^{2+} сигналов при переходе от относительно низких к высоким концентрациям агонистов (рис. 2Г). Таким образом, амплитуда ответов МСК на исследовавшиеся агонисты и лаг-период ответов демонстрировали принципиально разные дозозависимости, свидетельствуя о сложности механизма трансдукции.

Роль фосфоинозитидного каскада и Ca^{2+}-индуцированного Ca^{2+} выброса в трансдукции агонистов.

Сопряжении GPCR рецепторов с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} обычно обеспечивается за счет стимуляции G_q- и G_i-белками фосфолипазы С (phospholipase C, PLC), катализирующей гидролиз фосфолипида PIP_2 и продукцию растворимого (IP_3) и липидного (DAG) медиаторов, с последующей активацией внутриклеточного Ca^{2+} канала - IP_3-рецептора – и выброса Ca^{2+}, депонированного в Ca^{2+} депо [14]. Для выявления роли фосфоинозитидного каскада в генерации Ca^{2+} сигналов, инициируемых в цитоплазме МСК агонистами, нами использовался ингибиторный анализ. Оказалось, что прединкубация клеток в растворе, содержащим U73122 (2-5 мкМ), который практически необратимо ингибирует PLC, приводила к полному подавлению агонист-зависимых Ca^{2+} сигналов, включая инициированные норадреналином (17 клеток), ATP (39 клеток), UTP (7 клеток) и ADP (5 клеток) (рис. 3А-В, Ж-И). Ингибиторные эффекты U73122 были специфичными, поскольку его гораздо менее эффективный аналог U73343 (2-5 мкМ) никогда не подавлял клеточные ответы на агонисты (рис. 3А-В, Ж, З). Кроме того, снижение Ca^{2+} в наружном растворе с 2 мМ до уровня, близкого к внутриклеточному (260 нМ), приводило к незначительному изменению Ca^{2+} ответов, вызываемых норадреналином (31 клетка), ATP (26 клеток), ADP (13 клеток) и UTP (14 клеток) (рис. 3В, Г, Ж-И). Таким образом, агонисты, которые инициировали Ca^{2+} сигнализацию в МСК, стимулировали GPCR рецепторы, которые сопряжены фосфоинозитидным каскадом преимущественно с выбросом депонированного Ca^{2+} при пренебрежимом вкладе входа наружного Ca^{2+}. Следует отметить, что пороговая дозо-зависимость амплитуды Ca^{2+} ответов от концентрации агониста (рис. 1) и их незначительная зависимость от наружного Ca^{2+} (рис. 3В, Г, Ж-И) свидетельствуют о незначительном вкладе P2X рецепторов, являющихся АТФ-активируемыми Ca^{2+}-проницаемыми каналами [15], в генерацию ответов МСК на ATP.

Поскольку PLC ингибитор U73122 оказывал драматические эффекты на чувствительность МСК к агонистам, было мало сомнения в том, что IP_3 рецепторы, активность которых контролируется PLC [15], должны были быть одними из ключевых эффекторов в цепи трансдукции исследовавшихся лигандов. Как и ожидалось, в присутствии проникающего блокатора IP_3 рецепторов 2-APB (50 мкМ) были подавлены Ca^{2+} сигналы, инициировавшиеся в МСК ATP (21 клетка), норадреналином (19 клеток), ADP (9 клеток) и UTP (10 клеток) (рис. 3Г-И).

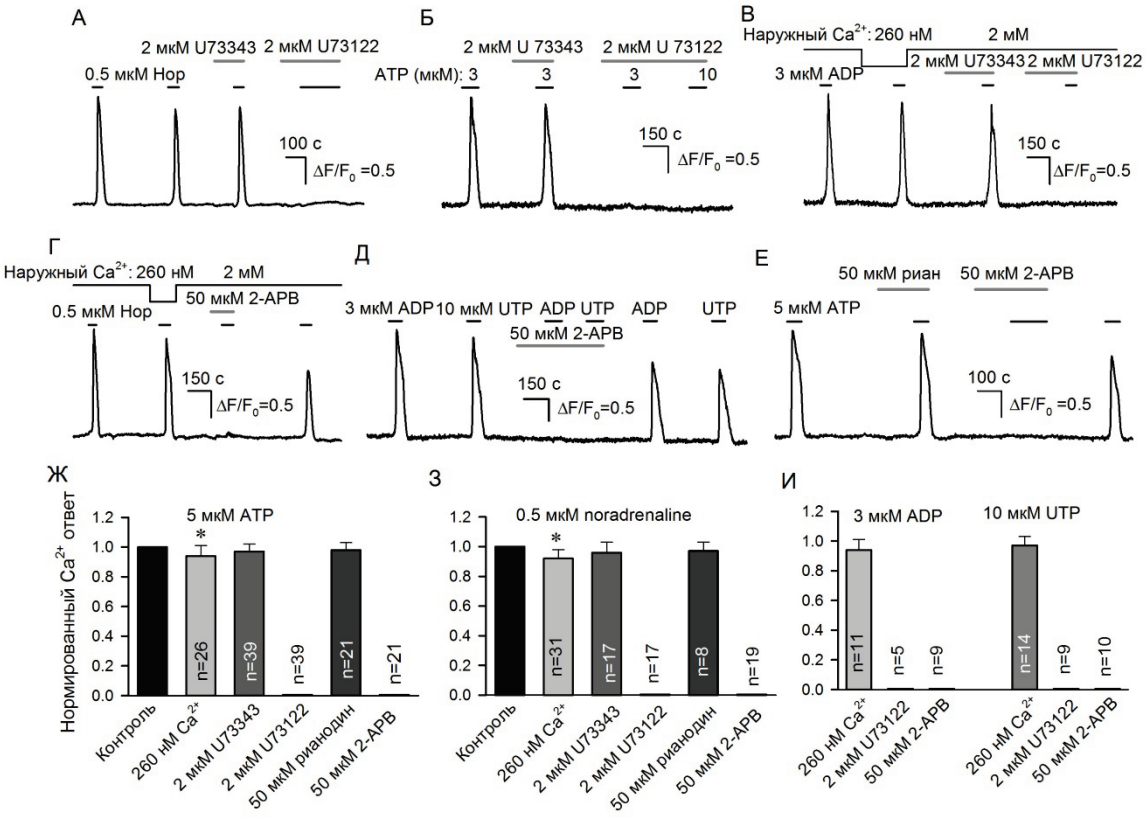


Рисунок 3. Фосфоинозитидный каскад обеспечивает трансдукцию агонистов
(А-В) Ингибитор PLC U73122 (2 мкМ) подавляет Ca2+ сигналы в МСК, инициированные различными агонистами, включая 0.5 мкМ норадреналин (А), 3 мкМ ATP (В) и 3 мкМ ADP (С).
(В, Г) Уменьшение Ca^{2+} во внеклеточном растворе с 2 мМ до 260 нМ слабо влияло на агонист-зависимые Ca^{2+} сигналы.
(Г-Е) Блокатор IP_3 рецептора 2-APB (50 мкМ) подавлял ответы МСК на агонисты, включая 0.5 мкМ норадреналин, 3 мкМ ADP, 10 мкМ UTP и 5 мкМ ATP.
(Е) Риандин (50 мкМ) (антагонист риандиновых рецепторов) не ингибировал ответы на агонисты, включая 5 мкМ ATP.
(Ж-И) Статистика изменения клеточных ответов на агонисты в контроле и в присутствии различных соединений; данные представлены как среднее ± стандартная девиация

Следует отметить, что 2-APB блокирует не только IP_3 рецепторы, но и ряд Ca^{2+}-проницаемых ионных каналов, обеспечивающих вход наружного Ca^{2+} [16-18]. Учитывая, однако, что наружный Ca^{2+} слабо влиял на агонист-зависимую Ca^{2+} сигнализация в МСК, эффекты 2-APB (рис. 3Г-Е) были обусловлены исключительно блокадой IP_3 рецепторов. В противоположность 2-APB ответы МСК на агонисты не ингибировались риандином (50 мкМ) (рис. 3Е-Ж) – антагонистом риандиновых рецепторов, являющимися еще одним типом внутриклеточных Ca^{2+} каналов, ответственных за высвобождение Ca^{2+} ионов из Ca^{2+} депо [19].

Имеются множественные публикации, в которых показаны градуальные зависимости клеточных ответов от концентрации агонистов [20-22]. В противоположность этому, величина Ca^{2+} ответов, инициируемых агонистами в МСК, следовала принципу “все-или-ничего” (рис. 1). Если в МСК трансдукция агонистов базируется преимущественно на PLC-зависимой продукции IP_3 и пропорциональному высвобождению депонированного Ca^{2+} через IP_3 рецепторы, то неясно, почему имеет место ступенчатая дозо-зависимость для амплитуды Ca^{2+} ответов (рис. 1), и почему при этом лаг-период ответов градуально уменьшается с концентрацией агониста (рис. 2). В поисках решения этой проблемы, мы предположили, что в МСК трансдукция агонистов базируется на двух механизмах – градуальном и триггерном. Стимулируя соответствующий GPCR рецептор, сопряженный с фосфоинозитидным каскадом, агонист первоначально вызывает локальный и небольшой по величине Ca^{2+} сигнал, который градуально растет с концентрацией агониста. В силу локальности, этот Ca^{2+} сигнал не разрешается при использовании не конфокальной оптики. При достижении определенного порога этот первоначальный Ca^{2+} сигнал стимулирует Ca^{2+}-индуцированный выброс Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release, CICR) [19, 23, 24] и тем самым усиливается до насыщающего и конвертируется в глобальный Ca^{2+}-сигнал. При таком развитии событий, амплитуда и форма агонист-зависимых Ca^{2+} сигналов должны слабо зависеть от концентрации агониста (рис. 1), в то время как задержка ответа, которая определяется временем достижения порогового уровня локальным Ca^{2+} сигналом, должна уменьшаться по мере увеличения интенсивности стимула (рис. 2).

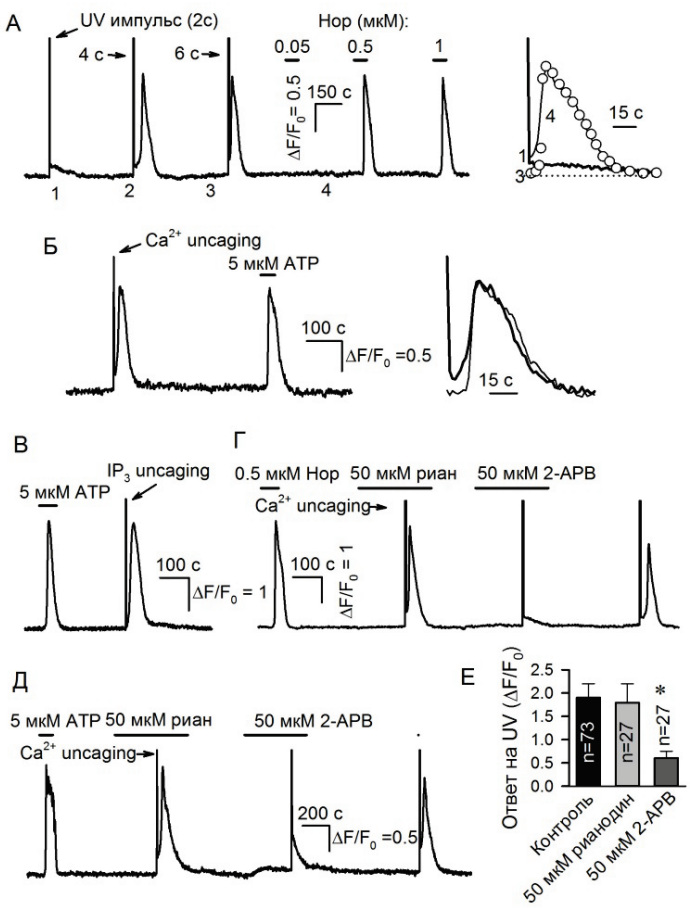


Рисунок 4. Ca^{2+}-индуцированный выброс Ca^{2+} в МСК.
(А) Левая панель – Ca^{2+} сигналы, инициированные в МСК фотолизом NP-EGTA под действием импульсов UV различной длительности и Ca^{2+} ответы на норадреналин при указанных концентрациях. Правая панель – наложение Ca^{2+} сигналов обозначенных в (А) как 1 (толстая линия), 3 (кружечки) и 4 (тонкая линия).
(Б) Левая панель – Ca^{2+} сигналы в МСК, вызванные фотолизом NP-EGTA (4 с импульс UV) (Ca^{2+} uncaging) и 5 мкМ ATP. Правая панель – наложение Ca^{2+} сигналов, вызванных импульсом UV (толстая линия) и ATP (тонкая линия).
(В) Внеклеточный ATP (5 мкМ) и импульс IP_3 в цитоплазме МСК (IP_3 uncaging, 2 с импульс UV) вызываю идентичные Ca^{2+} сигналы в клетках, нагруженных caged-Ins(145)P3.
(Г, Д) 2-APB (50 мкМ) полностью подавлял бифазные Ca^{2+} сигналы, вызванные фотолизом NP-EGTA, в то время как рианодин (50 мкМ) был неэффективен.
(Е) Статистика Ca^{2+} ответов, инициированных фотолизом NP-EGTA в контроле и в присутствии рианодина и 2-APB. Данные представлены как среднее ± стандартная девиация

Чтобы верифицировать предлагаемую гипотезу и продемонстрировать функциональность механизма CICR в МСК, мы использовали метод фотолиза химических групп (uncaging), нагружая клетки фотолабильным хелатором Ca^{2+} NP-EGTA или фоточувствительным предшественником IP_3 - caged-Ins(145)P3. Фотолиз NP-EGTA или caged-Ins(145)P3 импульсом ультрафиолета (UV) позволял генерировать в цитоплазме МСК скачок Ca^{2+} или IP_3, соответственно. В наших экспериментах фотолиз NP-EGTA выполнялся при умеренной интенсивности UV, чтобы высвобождать физиологически адекватное количество Ca^{2+} в течении нескольких секунд, тем самым контролируя задержку клеточных ответов на свет. В экспериментах с адренергическими (n=33) и пуринергичесгими (n=23) МСК, нагруженными NP-EGTA, было показано что, импульсы UV вызывают два типа Ca^{2+} ответов. Относительно короткие, обычно не превышающие 2 с импульсы UV продуцировали оптический артефакт и без видимой задержки небольшой скачок Ca^{2+}, который экспоненциально релаксировал к уровню покоя (рис. 4А, левая панель и толстая линия в правой панели). Последующие более продолжительные импульсы длительностью обычно 4 и 6 с могли вызывать бифазные Ca^{2+} сигналы одинаковой амплитуды (рис. 4А, левая панель), которые кинетически и по амплитуде были сходны с ответами на агонисты (рис. 4А, правая панель, рис. 4Б). Эти данные свидетельствовали о том, что механизм CICR функционален в МСК, и что именно этот процесс обеспечивает триггероподобное высвобождение депонированного Ca^{2+}, которое определяет кинетику и амплитуду ответов на агонисты. Согласно литературным данным лавинообразное высвобождение Ca^{2+} по механизму CICR может протекать при участии как рианодиновых рецепторов, так и IP_3 рецепторов [19, 23, 24]. В экспериментах с МСК, нагруженных caged-Ins(145)P3, импульсное высвобождение IP_3 инициировало Ca^{2+} сигналы как в пуринергических (n=12) так и адренергических (n=7) МСК, причем таковые были сходны с ответами на агонисты (рис. 4В). Это свидетельствовало о том, что главным образом IP_3 рецепторы обеспечивают лавинообразное высвобождение Ca^{2+} по механизму CICR. В подтверждение этому, 2-APB (50 мкМ) драматически подавлял клеточные ответы на скачки внутриклеточного Ca^{2+}, вызванные фотолизом NP-EGTA как в адренергических (n=16), так и в пуринергических (n=11) МСК (рис. 4Г, Д). В то же время, рианодин (50 мкМ) не ингибировал ответы ни на агонисты, ни на фотолиз NP-EGTA (рис. 4Г, Д).

Таким образом, проведенные эксперименты подтверждают, что в МСК трансдукция агонистов протекает в две сопряженные стадии и базируется на градуальном (агонист-зависимом) и триггерном по механизму CICR (агонист-независимом) высвобождении депонированного Ca^{2+}. Это объясняет почему дозо-зависимости амплитуды ответов на агонисты и их лаг-период носят скачкообразный и градуальный характер, соответственно.

Работа была поддержана Российским научным фондом (грант 18-14-00347).

Список литературы / References:

1. Kalinina N.I., Sysoeva V.Y., Rubina K.A., Parfenova Y.V., Tkachuk V.A. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta Naturae*, 2011, vol. 3. pp. 30-37.
2. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 10. pp. 709-716.
3. Baer P.C., Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/StemCells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International*, 2012, 812693.
4. Casiraghi F., Perico N., Cortinovis M., Remuzzi G. Mesenchymal stromal cells in renal transplantation: opportunities and challenges. *Nature Reviews. Nephrology*, 2016, vol. 12, pp. 241-253.
5. Scarfi S. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World Journal of Stem Cells*, 2014, vol. 6, pp. 153-162.
6. Forostyak O., Forostyak S., Kortus S., Sykova E., Verkhratsky A., Dayanithi G. Physiology of Ca^{2+} signalling in stem cells of different origins and differentiation stages. *Cell Calcium*, 2016, vol. 59, pp. 57-66.
7. Penicaud L. Relationships between adipose tissues and brain: what do we learn from animal studies? *Diabet and Metabolism*, 2010, vol. 36, pp. 39-44.
8. Cavaliere F., Donno C., D'Ambrosi N. Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2015, vol. 9, p. 211.
9. Glaser T., Cappellari A.R., Pillat M.M., Iser I.C., Wink M.R., Battastini A.M., Ulrich H. Perspectives of purinergic signaling in stem cell differentiation and tissue regeneration. *Purinergic Signal*, 2012, vol. 8, pp. 523-537.
10. Jiang L.H., Hao Y., Mousawi F., Peng H., Yang X. Expression of P2 Purinergic Receptors in Mesenchymal Stem Cells and Their Roles in Extracellular Nucleotide Regulation of Cell Functions. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, vol. 232, pp. 287-297.
11. Zimmermann H., Zebisch M., Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signaling*, 2012, vol. 8, pp. 437-502.
12. Burnstock G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Experimental Physiology*, 2014, vol. 99, pp. 16-34.
13. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, vol. 1843, pp. 1899-1908.
14. Berridge M.J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 2016, vol. 96, pp. 1261-1296.
15. Samways D.S., Li Z., Egan T.M. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, vol. 8, p. 6.
16. Xu S.Z., Zeng F., Boulay G., Grimm C., Harteneck C., Beech D.J. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *British Journal of Pharmacology*, 2005, vol. 145, pp. 405-414.
17. Mustafa T., Walsh J., Grimaldi M., Eiden L.E. PAC1hop receptor activation facilitates catecholamine secretion selectively through 2-APB-sensitive Ca^{2+} channels in PC12 cells. *Cellular Signaling*, 2010, vol. 22, pp. 1420-1426.
18. Harteneck C., Gollasch M. Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2011, vol. 12, pp. 35-41.
19. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. Calcium signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. Nature Reviews. *Molecular Cell Biology*, 2003, vol. 4, pp. 517-529.
20. Berg K.A., Clarke W.P., Sailstad C., Saltzman A., Maayani S. Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2A and type 2C receptor systems. *Molecular Pharmacology*, 1994, vol. 46, pp. 477-484.
21. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *Journal of Neurophysiology*, 2003, vol. 90, pp. 3283-3294.
22. Petrel C., Kessler A., Dauban P., Dodd R.H., Rognan D., Ruat M. Positive and negative allosteric modulators of the Ca2+-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, pp. 18990-18997.
23. Clapham D.E. Calcium Signaling. *Cell*, 2007, vol. 131, pp. 1047-1058.
24. Iino M. Spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} signaling and its physiological roles. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 2010, vol. 86, pp. 244-256.

AGONIST INDUCED CA^{2+} SIGNALING IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Kotova P.D., Ivashin D.S., Kolesnikov S.S.
Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences
Institutional Street, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: polinakotova88@gmail.com

Abstract. Mesenchymal stromal cells (MSCs) from different sources represent a heterogeneous population of proliferating non-differentiated cells that contains multipotent stem cells capable of originating a variety of mesenchymal cell lineages. By using Ca^{2+} imaging and the Ca^{2+} dye Fluo-4, we studied MSCs from the human adipose tissue and examined Ca^{2+} signaling initiated by purinergic agonists. Although all tested compounds were capable of mobilizing intracellular Ca^{2+} in MSCs, sensitivity of individual MSCs to a particular agonist varied from cell to cell. Being characterized by a relative change of Fluo-4 fluorescence, agonist-induced Ca^{2+} responses were generated in an "all-or-nothing" fashion. Specifically, at relatively low doses, agonists elicited undetectable responses but initiated quite similar Ca^{2+} transients of large magnitude at all concentrations above the threshold, which was nearly 0.1, 0.2, 0.5, 1, and 2 μM for noradrenaline, ADP, ATP, and UTP, respectively. The inhibitory analysis and Ca^{2+}/IP_3 uncaging pointed at the phosphoinositide cascade as a pivotal pathway responsible for agonist transduction and implicated Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release (CICR) mediated by IP_3 receptors in shaping agonists-dependent Ca^{2+} signals. Altogether, our data suggest that agonist transduction in MSCs includes two fundamentally different stages: an agonist initially triggers a local, gradual, and relatively small Ca^{2+} signal, which next stimulates CICR to accomplish transduction with a large and global Ca^{2+} transient. By involving the trigger-like mechanism CICR, a cell is capable of generating Ca^{2+} responses of virtually universal shape and magnitude at different agonist concentrations above the threshold.

***Key words**: Ca^{2+} signaling, G-protein coupled receptors, calcium-induced calcium release, IP_3 receptors, mesenchymal stromal cells.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВРЕМЯ-РАЗРЕШЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БЕЛКОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТАДИЙ ИХ ДЕНАТУРАЦИИ

Немцева Е.В.[1, 2], Герасимова М.А.[1], Лащук О.О.[1], Карузина Н.Е.[1], Гульнов Д.В.[1], Мельник Б.С.[3]

[1] Сибирский федеральный университет
пр. Свободный, 79, г. Красноярск, 660041, РФ
[2] Институт биофизики СО РАН ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»
Академгородок, 50/50, г. Красноярск, 660036, РФ
[3] Институт белка РАН
ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Исследование посвящено поиску новых информативных параметров для экспериментального определения структурных перестроек белков. Для этого было проведено сравнение кривых перехода, получаемых по характеристикам собственной флуоресценции белков при стационарных (непрерывное возбуждение) и время-разрешенных условиях (импульсное наносекундное возбуждение). Исследована равновесная денатурация мочевиной двух белков – карбоксиангидразы Б быка и бактериальной люциферазы, содержащих по семь триптофановых остатков. Проанализирована зависимость от концентрации мочевины следующих параметров флуоресценции: сдвиг спектра испускания при стационарных условиях, времена жизни, вклад спектральных компонент, ассоциированных с определённым временем жизни. Получено, что в случае карбоксиангидразы характеристики стационарной флуоресценции не отражают стадийность процесса денатурации, в отличие от параметров время-разрешенной флуоресценции. Это может быть связано с тем, что промежуточные состояния данного белка образуются при близких значениях концентрации мочевины. Стадии денатурации бактериальной люциферазы значительно разнесены по концентрации денатурирующего агента, поэтому они находят отражение, как в стационарных спектрах флуоресценции, так и в изменениях времен жизни. Обсуждается связь наблюдаемых различий в параметрах флуоресценции белков с локализацией их триптофановых остатков и общим механизмом денатурации.
***Ключевые слова**: собственная флуоресценция белков, равновесная денатурация, карбоксиангидраза Б, бактериальная люцифераза, время жизни флуоресценции, путь денатурации белка.*

ВВЕДЕНИЕ

Определение механизмов сворачивания/разворачивания биологических макромолекул по-прежнему является одной из актуальных проблем молекулярной биофизики. Для исследования конформационных переходов белков широко применяются методы флуоресцентной спектроскопии. Одной из причин является чувствительность внутренних флуорофоров белков – триптофановых остатков к изменению физико-химических характеристик микроокружения, в частности, полярности [1, 2]. Разворачивание белковых глобул, как правило, сопровождается батохромным смещением спектра флуоресценции, и зависимость параметров, описывающих положение и форму спектра испускания, от концентрации денатурирующего агента характеризует переход белка из одного состояния в другое. Однако, использование такого подхода для описания процесса разворачивания белка, в котором образуются дополнительные структурные формы, –отличные от нативного и денатурированного состояния, встречает ряд трудностей, например, связанных с зависимостью получаемых переходов от длины волны испускания, выбранной для расчета. Зачастую, по изменению стационарных спектров флуоресценции белков промежуточные стадии денатурации не видны. Дополнительными информативными параметрами люминесценции, не зависящими от длины волны испускания и концентрации флуорофоров, могут стать время-разрешенные характеристики, такие как времена жизни и ассоциированные с ними спектральные компоненты. Ограниченное использование данных характеристик в настоящее время, вероятно, объясняется, с одной стороны, определёнными техническими сложностями регистрации спадов флуоресценции в наносекундном масштабе, а с другой – сложностью интерпретации получаемых данных в отношении белков. В частности, известно, что флуоресценция триптофана, как в составе белков, так и в свободном состоянии в растворах, описывается двумя-тремя временами жизни [2-5].

Целью данного исследования являлось сравнение информативности методов стационарной и время-разрешенной спектроскопии для определения структурных переходов многотриптофановых белков в процессе равновесной денатурации на примере карбоксиангидразы Б и бактериальной люциферазы. Первый белок был выбран как хорошо изученный модельный объект, для которого установлена стадийность процесса разворачивания различными методами [6-8]. Денатурация бактериальной люциферазы исследована в гораздо меньшей степени, для близкого гомолога этого фермента была предложена трёхстадийная схема разворачивания [9, 10]. Оба исследованных белка содержат в своём составе по семь триптофановых остатков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили рекомбинантные белки: карбоксиангидраза Б быка (КАБ), полученная в группе спектроскопии белка Института белка РАН (г. Пущино), и люцифераза бактерий (БЛ) *Photobacterium leiognathi*, произведенная в лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск). Для проведения равновесной денатурации белки инкубировали в течение не менее 18 ч. в растворах мочевины с концентрацией от 0,5 до 7,5 М, после чего проводили измерения оптических характеристик.

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Cary 5000i (Agilent Technologies). Для измерения флуоресценции использовали спектрометр Fluorolog 3-22 (Horiba Scientific) с приставкой для регистрации спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Стационарные спектры регистрировали при возбуждении ксеноновой лампой (длина волны 295 нм). Разрешенные во времени спады флуоресценции измеряли при возбуждении лазерным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 296 нм и длительностью импульса <1,2 нс. Спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 305–410 нм с шагом 5 нм и разрешением 27 пс/канал.

Полученные спектры флуоресценции корректировали с учетом чувствительности прибора, объемного разведения, фонового сигнала растворителя и эффекта внутреннего фильтра.

Времена жизни определяли с помощью метода деконволюции [11], для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox. Обработку разрешенных во времени спадов флуоресценции проводили с помощью специальной программы DAS6 v.6.6 (Horiba Scientific) методом глобального анализа, суть которого заключается в одновременном описании всей совокупности спадов на разных длинах волн с подбором времен жизни и их вкладов на каждой длине волны [12]. Качество аппроксимации оценивали по статистическим критериям – взвешенным остаткам и χ^2.

Спад интенсивности флуоресценции во времени описывали как сумму экспонент:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i),$$

где τ_i – время жизни; α_i – амплитудный коэффициент *i*-компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в флуоресценцию на определенной длине волны рассчитывали как

$$f_i^{\lambda} = \frac{\alpha_i^{\lambda} \tau_i}{\sum_i \alpha_i^{\lambda} \tau_i}.$$

Общий спектральный вклад *i*-компоненты в интенсивность флуоресценции в стационарных условиях, A_i, определяли с помощью выражения:

$$A_i = \frac{\sum_{\lambda} I_{ss}^{\lambda} f_i^{\lambda}}{\sum_{\lambda} I_{ss}^{\lambda}} \cdot 100\%,$$

где I_{ss}^{λ} – стационарный спектр флуоресценции; f_i – вклад *i*-компоненты времени жизни на длине волны λ.

Анализ и обработку результатов проводили с применением прикладных программ Microsoft Excel и Microcal Origin Pro 8.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Были измерены спектры поглощения и флуоресценции модельных белков после инкубирования в растворах мочевины 0,5-7,5 М. Флуоресценцию при стационарных условиях регистрировали при возбуждении длиной волны 295 нм, следовательно, она была обусловлена вкладом только триптофановых остатков. Получено, что в нативном состоянии максимумы флуоресценции люциферазы и карбоксиангидразы располагаются при 333 нм и 338 нм, соответственно, и после разворачивания глобул батохромно смещаются до 345 нм (рис. 1А). По изменению отношения интенсивностей I_{325}/I_{390} также видно, что если в нативном состоянии форма спектра двух белков различается, то после денатурации триптофановые остатки обеих белков оказываются в сходном микроокружении (рис. 1Б), что выполняется и для других типов белков [13]. При этом для КАБ можно определить переход с серединой при 6,0 ± 0,1 М, а для БЛ наблюдается два перехода с серединами при 1,8±0,1 и 4,1±0,1 М (рис. 1Б).

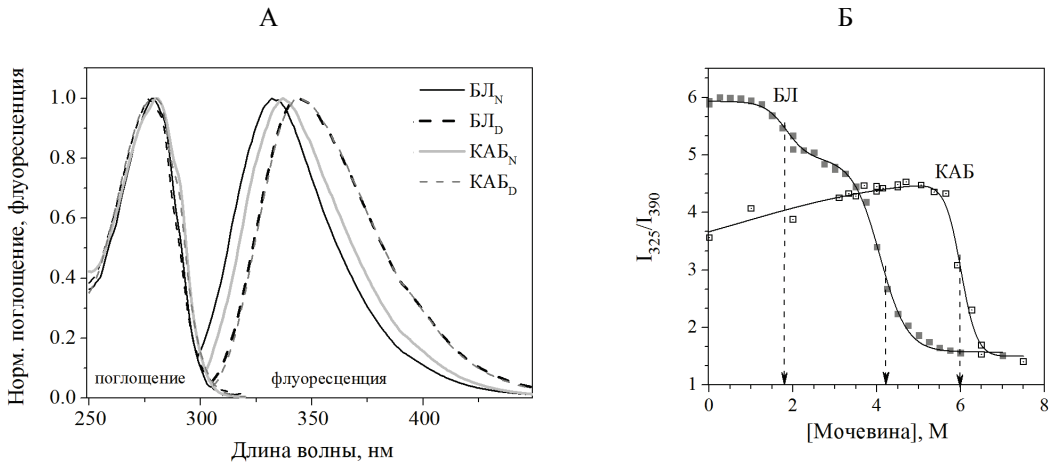


Рисунок 1. (А) Спектры поглощения и флуоресценции карбоксиангидразы и люциферазы в нативном (N) и денатурированном (D) состоянии; (Б) зависимость отношения интенсивностей при 325 и 390 нм для спектров стационарной флуоресценции белков от концентрации мочевины. Стрелками указаны середины переходов

Глобальный анализ спадов флуоресценции в диапазоне 305-410 нм показал наличие трёх времён жизни, характеризующих флуоресценцию белков, τ_1, τ_2 и τ_3, со значениями около 5-6, 1-2 и <0,3 нс соответственно. Поскольку разрешение экспериментальной установки не позволяет с достаточной точностью регистрировать значение короткой компоненты τ_3, а её вклад в флуоресценцию белков не превышает 10 %, данное время жизни было исключено из дальнейшего рассмотрения.

Обнаружено, что денатурация белков приводит к уменьшению времени жизни τ_1 как КАБ, так и БЛ, в то время как τ_2 изменяется по-разному (рис. 2А). Для карбоксиангидразы наблюдается увеличение τ_2 от 1,1 до 2,0 нс, а для люциферазы – лишь небольшое уменьшение от 2,1 до 1,8 нс. В случае люциферазы по изменению как τ_1, так и τ_2 определяется два перехода с серединами около 1,1 ± 0,1 и 4,5 ± 0,1 М мочевины. То есть, оба времени жизни реагируют на одни и те же конформационные перестройки белка. В отличие от этого, времена жизни τ_1 и τ_2 карбоксиангидразы отражают разные переходы, с серединами при 6,4 ± 0,1 и 5,7 ± 0,1 М, соответственно (рис. 2А). Рассчитанные по временам жизни карбоксиангидразы середины переходов хорошо совпадают с данными о стадиях денатурации этого белка, полученными кинетическими методами [14].

Для карбоксиангидразы в ходе денатурации значительно изменяются не только значения времен жизни флуоресценции τ_i, но и их спектральные вклады A_i (рис. 2, Б, треугольные маркеры). Если в нативном состоянии 80% флуоресценции этого белка обусловлено компонентой с временем жизни τ_1, то после потери структуры вклады τ_1 и τ_2 приблизительно выравниваются. Интересно, что для бактериальной люциферазы не наблюдается существенного перераспределения вкладов временны**х** компонент в ходе денатурации (рис. 2Б, квадратные маркеры).

Модельные расчеты, основанные на анализе кристаллической структуры карбоксиангидразы (PDB: 1V9E) и люциферазы (PDB: 3FGC), позволяют определить физические параметры микроокружения триптофановых остатков и соотнести эти флуорофоры в составе белков с пятью возможными спектральными классами [15-17].

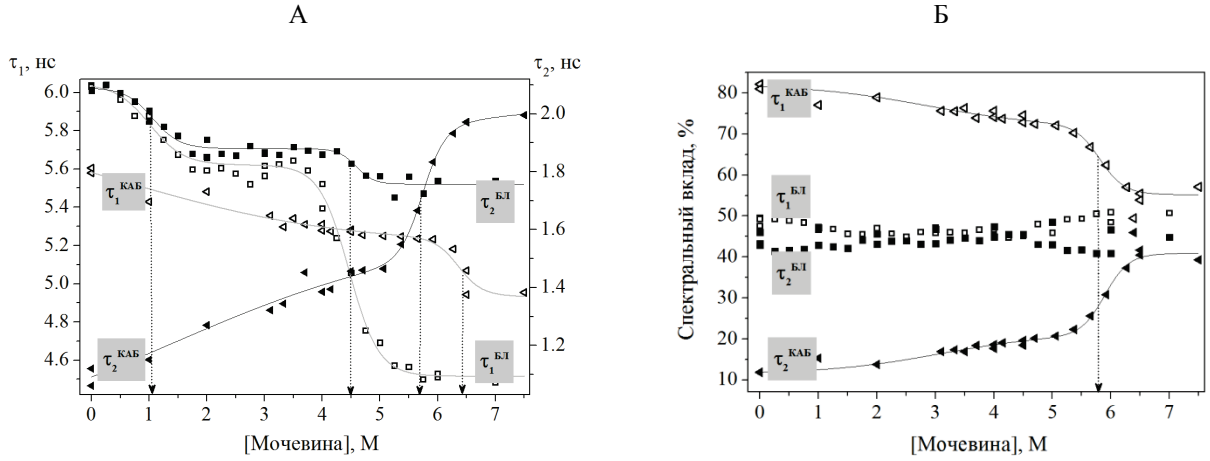


Рисунок 2. Зависимость компонент времени жизни флуоресценции (А) и их спектральных вкладов (Б) от концентрации мочевины: τ_1 (белые маркеры) и τ_2 (черные маркеры) для карбоксиангидразы (треугольные маркеры) и люциферазы (квадратные маркеры). Стрелками указаны середины переходов

Так, для структуры люциферазы *Photobacterium leiognathi* установлено, что αTrp40 погружён в белковую глобулу (класс S), но его флуоресценция может быть затушена близлежащим αCys170, либо полярными аминокислотами αThr38, αThr73, αAsn321, αSer22 и αThr323. Оказалось, что большая часть триптофановых остатков в составе люциферазы принадлежит спектральному классу I (αTrp182, αTrp194, βTrp182 и βTrp250). αTrp194 принадлежит классу II, т.е. экспонирован в связанную воду, а αTrp277 – классу III. [17] Сопоставление количества триптофановых остатков разных классов с характерными для них максимумами флуоресценции объясняет положение спектра испускания нативной люциферазы.

Другая картина наблюдается для карбоксиангидразы. Согласно расчетам, три триптофановых остатка КАБ (Trp15, Trp96 и Trp207) с большой вероятностью относятся к спектральному классу S и один (Trp190) – к классу I [14]. Это означает, что данные остатки глубоко погружены внутрь белковой глобулы. Trp122 может быть ассоциирован с классом S или I, Trp4 и Trp243 – с классами I или II. Таким образом, положение спектра стационарной флуоресценции карбоксиангидразы с максимумом при 338 нм может быть результатом того, что основной вклад в флуоресценцию вносят Trp4, Trp243, Trp190, в то время как остальные флуорофоры плотно упакованы внутри белковой глобулы и имеют низкий квантовый выход [1, 2, 18, 19]. Кроме того, наличие большого числа погруженных в гидрофобное окружение триптофанов у карбоксиангидразы, вероятно, делает более чувствительным к процессу денатурации такой параметр как τ_2.

Как отмечалось выше, соотнесение регистрируемых параметров время-разрешенной флуоресценции белка с конкретными триптофановыми остатками в его составе значительно осложнено тем фактом, что каждый триптофановый остаток проявляет два-три времени флуоресценции [3, 4]. Таким образом, флуоресценция исследованных белков, содержащих по семь триптофанов, потенциально может содержать до 21 временн***о***й компоненты, которые разбиваются на три группы и регистрируются как τ_1, τ_2 и τ_3. В такой ситуации трудно говорить о свойствах индивидуального триптофанового остатка, а можно только предположить принадлежность характеристик отдельным группам триптофанов (например, внутренним или внешним).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования говорят о том, что характеристики время-разрешенной флуоресценции белков могут нести дополнительную информацию о стадийности структурных изменений этих макромолекул.

Так, в случае карбоксиангидразы Б параметры стационарной флуоресценции показывают «усреднённый» переход и не отражают стадийность процесса денатурации, потому что промежуточные состояния белка образуются при близких концентрациях мочевины. При этом изменение времён жизни флуоресценции ясно указывает на наличие двух стадий, что подтверждается кинетическими методами.

Для бактериальной люциферазы стадии денатурации значительно разнесены по концентрации мочевины, поэтому они находят отражение, как в стационарных спектрах флуоресценции, так и в изменениях времен жизни.

Разница в трехмерной структуре исследованных белков проявляется в направлении изменения одной из временн***ы***х компонент (~ 2 нс) и характере перераспределения спектральных вкладов в ходе денатурации. Это может быть связано с наличием большего количества глубоко погруженных в глобулу триптофановых остатков у карбоксиангидразы Б по сравнению с бактериальной люциферазой.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (гранты № 6.7734.2017 и № 01201351504), а также РФФИ, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки.

Список литературы / References

1. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. *New York: Springer Science*, 2006.

2. Chen Y., Barkley M.D. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, pp. 9976-9982.

3. Albani J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 1. Fluorescence lifetimes origin of tryptophan free in solution. *J. Fluoresc.*, 2014, vol. 24, pp. 93-104.

4. Albani J.R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins. *J. Fluoresc.*, 2014, vol. 24, pp. 105-117.

5. Engelborghs Y. The analysis of time resolved protein fluorescence in multi-tryptophan proteins. *Spectrochim. Acta A.*, 2001, vol. 57, pp. 2255-2270.

6. Semisotnov G.V., Uversky V.N., Sokolovsky I.V., Gutin A.M., Razgulyaev O.I., Rodionova N.A. Two slow stages in refolding of bovine carbonic anhydrase B are due to proline isomerization. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 213, pp. 561-568.

7. Melnik B.S., Marchenkov V.V., Evdokimov S.R., Samatova E.N., Kotova N.V. Multy-state protein: Determination of carbonic anhydrase free-energy landscape. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, vol. 369, pp. 701-706.

8. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Kutyshenko V.P., Ebert B., Blanck J., Ptitsyn O.B. Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B. *FEBS Lett.*, 1987, vol. 224, pp. 9-13.

9. Inlow J.K., Baldwin T.O. Mutational analysis of the subunit interface of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase. *Biochemistry*, 2002, vol. 41, pp. 3906-3915.

10. Deeva A.A., Temlyakova E.A., Sorokin A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, pp. 3053-3057.

11. Ameloot M., Hendrickx H. Extension of the performance of Laplace deconvolution in the analysis of fluorescence decay curves. *Biophys. J*., 1983, vol. 44, pp. 27-38.

12. Beechem J.M., Gratton E., Ameloot M., Knutson J.R., Brand L. The global analysis of fluorescence intensity and anisotropy decay data: second-generation theory and programs *In* Topics in fluorescence spectroscopy, *Springer*, Boston, MA, 2002, pp. 241-305.

13. Nemtseva E.V., Lashchuk O.O., Gerasimova M.A. Similarity of decay-associated spectra for tryptophan fluorescence of proteins with different structures. *Biophysics*, 2016, vol. 61, pp. 193-199.

14. Nemtseva E.V., Lashchuk O.O., Gerasimova M.A., Melnik T.N., Nagibina G.S., Melnik B.S. Fluorescence lifetime components reveal kinetic intermediate states upon equilibrium denaturation of carbonic anhydrase II. *Methods and applications in fluorescence*, 2018, vol. 6, pp. 015006.

15. Reshetnyak Y.K., Koshevnik Y., Burstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys. J*., 2001, vol. 81, pp. 1735-1758.

16. Shen C., Menon R., Das D. [et al.] The protein fluorescence and structural toolkit: Database and programs for the analysis of protein fluorescence and structural data. *Proteins*, 2008, vol. 71, pp. 1744-1754.

17. Deeva A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. Structural properties of tryptophan microenvironment in bacterial luciferase. *Luminesc.*, 2014, vol. 29, pp. 72-73.

18. Slyusareva E.A., Gerasimova M.A., Sizykh A.G., Gornostaev L.M. Spectral and fluorescent indication of the acid-base properties of biopolymer solutions. *Russ. Phys. J.*, 2011, vol. 54, pp. 485-492.

19. Tsuboi T., Penzkofer A., Slyusareva E., Sizykh A. Photoluminescence properties of fluorone dyes in bio-related films at low temperatures. *J. Photochem. Photobiol. A.*, 2011, vol. 222, pp. 336-342.

APPLICATION OF THE TIME-RESOLVED FLUORESCENCE TO THE CHARACTERIZATION OF PROTEINS UNFOLDING PATHWAYS

Nemtseva E.V.[1, 2], Gerasimova M.A.[1], Lashchuk O.O.[1], Karuzina N.E.[1], Gulnov D.V.[1], Melnik B.S.[3]

[1] Siberian Federal University

Svobodny pr., 79, Krasnoyarsk, 660041, Russia

[2] Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center 'Krasnoyarsk Science Center SB RAS'

Akademgorodok, 50/50, Krasnoyarsk, 660036, Russia

[3] Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya st., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: enemtseva@sfu-kras.ru

Abstract. The study contributes to the development of experimental methods capable of detecting the intermediate states of proteins upon equilibrium denaturation. The urea-induced transition curves of bovine carbonic anhydrase II and bacterial luciferase obtained from steady-state and time-resolved fluorescence were compared. The dependence of the following fluorescence parameters on the urea concentration was analyzed: the shift of the steady-state emission spectrum, the lifetimes, and the spectral contribution of the lifetime components. It was found that for carbonic anhydrase the steady-state fluorescence does not reflect the multi-stage denaturation, in contrast to the time-resolved fluorescence parameters. This can be due to the fact that the intermediate states of carbonic anhydrase are formed at close urea concentrations. For bacterial luciferase the transition midpoints of unfolding stages are significantly separated by urea concentration scale, so they can be seen both in steady-state fluorescence spectra and in lifetimes change. The observed differences in the fluorescence parameters of two proteins were discussed in terms of tryptophan residues location and the general mechanisms of unfolding pathways.

***Key words**: intrinsic fluorescence of proteins, equilibrium denaturation, carbonic anhydrase II, bacterial luciferase, fluorescence lifetime, protein unfolding pathway.*

ДИНАМИКА РОСТА И МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВОДНОГО ПЕРЕНОСА В ИНТАКТНЫХ КОРНЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ГАЗОВОГО СОСТАВА АТМОСФЕРЫ

Суслов М.А., Анисимов А.В.

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение
ФГБУН "Федеральный исследовательский центр "Казанский научный центр Российской академии наук"
ул. Лобачевского, 2/31, г. Казань, 420111, РФ; e-mail: makscom87@mail.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. В данной работе с помощью спин-эхо метода ЯМР исследовано влияние газового состава атмосферного воздуха на динамику роста и межклеточного переноса воды в корнях интактных корней кукурузы. В работе использован оригинальный методический и технический подход, позволяющий проводить регистрацию параметров водного переноса и скорости роста растений непосредственно при изменении концентрации газов атмосферного воздуха. Было показано, что процессы транспорта воды и роста растений более чувствительны к снижению концентрации кислорода при его замещении азотом и углекислым газом. В условиях кислородного голодания происходило снижение как скорости роста, так и межклеточного переноса воды в корнях. При этом реакция водотранспортной системы растений на повышение концентрации CO_2 имеет более выраженный характер по сравнению с повышением концентрации азота, что свидетельствует о преобладающей регуляторной роли углекислого газа в процессах газообмена и водообмена растений. Повышение концентрации кислорода в атмосфере до 60 % не приводило к заметным изменениям в скорости роста и межклеточного транспорта воды в корнях.
Ключевые слова: *ядерно-магнитный резонанс, межклеточный транспорт воды, рост растений, концентрация атмосферных газов.*

ВВЕДЕНИЕ

Транспорт воды в растениях является жизненно-важным интегральным процессом, определяющим рост и продуктивность растений [1]. Использование водных ресурсов растениями напрямую зависит от водопоглощения и проводимости корневой системы растений. При этом процессы транспорта воды и функционирование корневой системы в растениях нельзя рассматривать отдельно от функционирования наземной части растений, в которой происходят процессы газообмена, такие как фотосинтез, дыхание, транспирация. Вопрос о том, как связаны между собой межклеточный транспорт воды в корне и газообмен в листьях растений остаётся открытым и актуальным из-за недостатка экспериментальных данных, что в свою очередь может являться следствием методических и технических проблем исследования [2]. Ввиду того, что растения активно используют газы атмосферного воздуха в своём метаболизме, изменяя концентрацию и состав газов атмосферы, можно повлиять на функционирование корневой системы и водный статус всего растения в целом. В частности, известно, что повышенная концентрация CO_2 может приводить к увеличению эффективности водопоглощения некоторых растений [3]. Предполагается, что водный статус растений в условиях повышенного парциального давления углекислого газа, гипоксии (недостаток кислорода), солевого стресса, может поддерживаться в норме благодаря изменению функциональной активности и/или численности аквапоринов в клетках листьев и корней растения [4, 5]. Снижение концентрации кислорода, также необходимого для дыхания растений, может приводить к развитию гипоксии и снижению биомассы и продуктивности растений. Если же уменьшить количество азота в атмосфере, то будут страдать, например, такие растения как соевые бобы, которые перерабатывают азот N_2 в пригодные для использования азотные соединения. Однако следует учитывать, что разные виды растений могут по-разному реагировать на изменение концентрации газов атмосферы. Например, повышенная концентрация CO_2 оказывает позитивное влияние в большей степени на С3 растения (ячмень, пшеница, рис), улучшая их углеродное питание, в отличие от С4-растений (кукуруза, сорго, просо), которые в основном не дают положительной реакции на повышение концентрации CO_2 в окружающей среде [3]. Таким образом, через влияние на газообмен растений, можно повлиять на прирост биомассы и продуктивность растений, что несомненно является перспективной задачей. Еще один аспект в актуальности данной темы связан с исследованием адаптации растений к условиям, характерным для закрытых экспериментальных экосистем, а также к естественному изменению климата, который сопровождается повышением температуры и концентрации углекислого газа в атмосфере [6], с целью получения возможности в будущем рационализировать использование водных ресурсов и контролировать процессы, влияющие на продуктивность и устойчивость растений. В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы является исследование, с применением оригинального методического подхода на базе ЯМР, функционального ответа корневой системы интактных растений кукурузы, в частности процесса роста и межклеточного водного переноса, на изменение концентрации основных газов атмосферного воздуха, таких как азот, кислород и углекислый газ. При этом основной интерес в данной работе представляет регистрация ответной реакции корневой системы в первые часы после начала воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве образцов использовали 4-7-дневные интактные растения кукурузы, выращенные на гидропонике. В работе был применён оригинальный методический и технический подход, заключающийся в непрерывной регистрации скорости роста и параметров водного переноса в корне растений непосредственно при изменении концентрации газов атмосферного воздуха. Растения в количестве от 15 до 20 штук помещали в оригинальную камеру из оргстекла, оснащённую датчиками концентрации кислорода и углекислого газа, сопряжённую с ЯМР спектрометром Spin Track 19 MHz (Resonance Systems) и газовой системой, описанной в работе [7]. Корни интактных растений при этом находились непосредственно в датчике ЯМР. Изменение концентрации газов атмосферного воздуха, таких как азот N_2, кислород O_2 и углекислый газ CO_2, производили непосредственно в камере в листовой зоне растений. Максимальная концентрация азота достигала 100 %, кислорода – 60 %, углекислого газа – 10 %.

Для контроля параметров межклеточного транспорта воды в корнях растений была использована техника спинового эха с импульсным градиентом магнитного поля (ЯМР ИГМП) на частоте протонного резонанса 19 МГц. В измерениях использовали трёхимпульсную последовательность стимулированного эха. Регистрировали относительную амплитуду сигнала спин-эха (фактор R) в зависимости от длительности – δ и амплитуды – g импульсов градиента, при изменении интервала t_d между ними как параметра

$$R = \exp(-\gamma^2\delta^2 g^2 t_d D_{эфф}).$$

Для количественной оценки диффузионного переноса воды использовали формализм эффективных коэффициентов диффузии [8]. Средний эффективный коэффициент диффузии $D_{эфф}$ определяли по декременту диффузионного затухания намагниченности образца при $g \to 0$, т.е. по наклону начального участка затухания, экстраполируемого экспонентой [9]**.** Для сведения к минимуму разброса данных из-за шумов аппаратуры во всех измерениях использовалось не менее чем десятикратное накопление сигналов намагниченности с 4-х шаговым фазовым циклированием р/ч импульсов и опорного р/ч напряжения на фазовый детектор. Вычисление проницаемости p клеток образца для воды производили с использованием уравнения Крика [10]. Вклад аквапоринов в межклеточный перенос воды определяли с помощью ингибиторного анализа, путём изменения водно-транспортной активности аквапоринов под действием ингибитора (хлорид ртути) в концентрации 200 мкМоль/л [11].

Скорость роста корней интактных растений кукурузы измеряли в динамике непосредственно при изменении концентрации газов атмосферного воздуха с помощью оригинальной камеры с прозрачным дном и магнитоуправляемыми манипуляторами [12]. Для измерения скорости роста камеру, с уложенными на стеклянную поверхность образцами, устанавливали прозрачным окном на рабочую поверхность сканера. Процедура оценки роста связана с периодической фоторегистрацией образцов в камере через прозрачное окно с помощью компьютерного сканера и последующей обработки полученных изображений в программе MacBiophotonics ImageJ. Точность определения прироста длины объектов составляла 0,1 мм. Для статистической обработки данных использовали программу Origin 8.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе были проведены эксперименты с пониженным содержанием кислорода в листовой зоне растений. Снижение концентрации кислорода достигалось за счёт его замещения чистым азотом с сохранением абсолютного давления на уровне нормального атмосферного. При снижении концентрации кислорода в камере наблюдалось уменьшение прироста корней растений кукурузы. На рисунке 1 представлена зависимость прироста длины корней от времени воздействия при полном замещении кислорода азотом. В условиях 100 % концентрации азота в камере, прирост длины корней снижался приблизительно в 3 раза, но не ингибировался полностью (рис. 1). При этом интенсивность межклеточного водообмена в корнях снижалась незначительно через 1 час после начала воздействия, о чём свидетельствует небольшое уменьшение скорости диффузионного затухания по сравнению с контролем (рис. 2). Средний эффективный коэффициент диффузии воды в клетках корней в контроле составил $(0{,}64\pm0{,}03)\cdot10^{-9}$ м^2/с, при воздействии 100 % концентрации азота – $(0{,}58\pm0{,}02)\cdot10^{-9}$ м^2/с. Объяснением снижения скорости роста и межклеточного водообмена может являться развитие гипоксии (кислородного голодания) в клетках и тканях растений, в результате чего протекание физиологически важных процессов на нормальном уровне становится невозможным. Стоит также отметить, что при восстановлении концентрации азота до нормальных значений скорость роста корней проростков в течение 30 минут восстанавливалась до контрольных значений (данные не приведены).

В работе [13] было показано, что уменьшение концентрации кислорода, растворённого в питательной жидкой среде или во внешнем атмосферном воздухе? приводит к заметному снижению скорости роста корней проростков кукурузы. При этом повышение концентрации кислорода от 21 %, т.е. от нормального значения, до 60 % не вызывало никаких изменений в скорости роста корней [13]. Уменьшение концентрации кислорода имело схожий эффект в длительных экспериментах на растениях салата, где было показано, что площадь поверхности

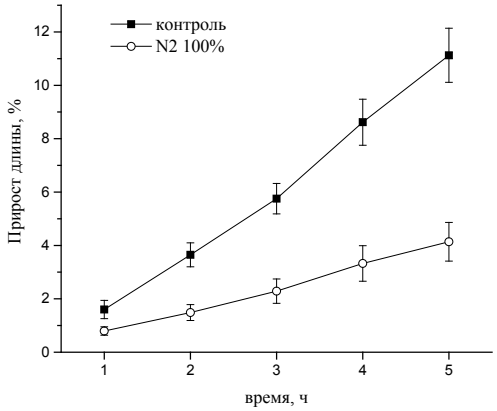


Рисунок 1. Прирост длины корней 4-х дневных проростков кукурузы в процентах к первоначальной длине, измеренный для контрольных растений и для растений, находящихся в условиях 100 % концентрации азота в атмосфере

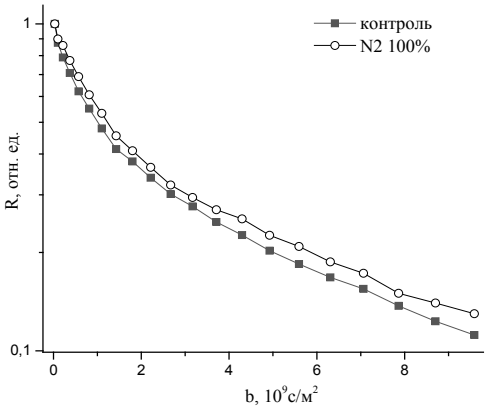


Рисунок 2. Диффузионные затухания намагниченности воды в клетках интактных корней кукурузы в контроле и через 2 часа после повышения концентрации азота N_2 в листовой зоне до 100 % в условиях нормобарии во внешней воздушной среде ($b = \gamma^2\delta^2g^2t_d$)

листьев растений, выращенных при пониженной до 3 % концентрации кислорода в воздухе, была значительно меньше по сравнению с контролем (при 21 % O_2) [14], однако повышение концентрации растворённого в корневой среде кислорода (до 23 мг/л) приводило к увеличению прироста биомассы корней и листьев [15]. В наших экспериментах повышение концентрации кислорода в воздухе до 60 % не приводило к изменению интенсивности межклеточного транспорта воды в корнях (рис. 3).

Скорость роста корней при этом также не изменялась (данные не приведены), что согласуется с результатами, полученными на корнях кукурузы в работе [13]. Этот факт можно объяснить тем, что в нормальных условиях количество кислорода в тканях корня достаточно для поддержания метаболизма на оптимальном уровне и дальнейшее повышение концентрации кислорода может привести только к кислородной интоксикации.

На следующем этапе были проведены эксперименты с уменьшением концентрации кислорода посредством повышения концентрации углекислого газа. Как видно из рисунка 4, при повышении концентрации CO_2 в листовой зоне растений до 10 %, с сохранением абсолютного давления на уровне 1 атмосферы (нормобария), происходит уменьшение скорости диффузионного затухания по сравнению с контролем, что свидетельствует об уменьшении коэффициента диффузии воды в клетках корней. При этом суммарная диффузионная проницаемость клеток для воды в радиальном направлении корней в течение 30 минут с момента повышения уровня CO_2 уменьшалась с $(4{,}4\pm0{,}3)\cdot10^{-5}$ м/с до $(2{,}3\pm0{,}2)\cdot10^{-5}$ м/с (рис. 5).

Следует учитывать, что концентрация углекислого газа в атмосфере в нормальных условиях составляет лишь 0,03-0,04 %, что во много раз меньше концентрации азота (79 %) и кислорода (21 %), и в связи с этим повышение CO_2 в эксперименте до 10 % за счёт замещения других газов, может также приводить к развитию гипоксии в клетках. Однако в сравнении с опытом со 100 % концентрацией азота (рис. 2), т.е. почти при полном отсутствии кислорода, повышение концентрации CO_2 до 10 % приводит к гораздо более заметному снижению

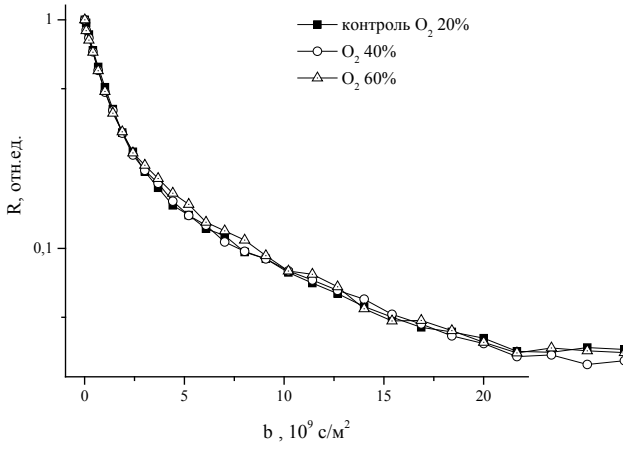


Рисунок 3. Диффузионные затухания намагниченности воды в клетках интактных корней кукурузы в контроле и через 30 минут после повышения концентрации O_2 в листовой зоне до 40 % и 60 % в условиях нормобарии во внешней воздушной среде ($b = \gamma^2\delta^2g^2t_d$)

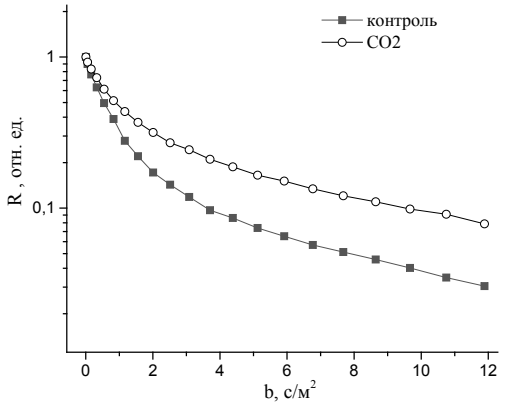


Рисунок 4. Диффузионные затухания намагниченности воды в клетках интактных корней кукурузы в контроле и через 30 минут после повышении концентрации CO2 в листовой зоне до 10 % в условиях нормобарии во внешней воздушной среде ($b = \gamma^2\delta^2g^2t_d$)

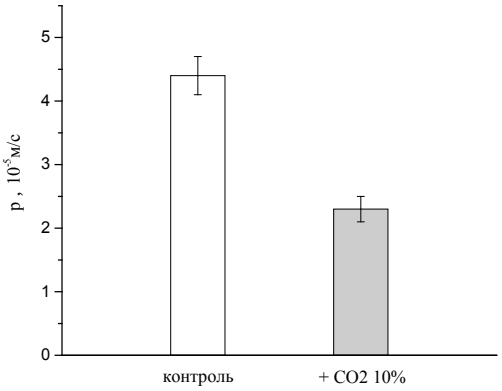


Рисунок 5. Суммарная диффузионная проницаемость клеток для воды в радиальном направлении всасывающей зоны корней интактных растений кукурузы в контроле и при повышении концентрации CO_2 в листовой зоне до 10 % в условиях нормобарии

интенсивности межклеточного водообмена в корнях. С одной стороны это может быть связано с большей скоростью диффузии углекислого газа в тканях и клетках по сравнению с азотом ($N_2 \approx 0{,}27\cdot10^{-9}$ м^2/с, $CO_2 \approx 2{,}32\cdot10^{-9}$ м^2/с [16], а с другой стороны с его метаболической активностью. Объяснением наблюдаемого эффекта уменьшения диффузионной водной проводимости в корне может быть реакция устьиц на изменение концентрации внешнего CO_2 [17, 18]. Известно, что повышение уровня CO_2 может приводить к закрытию устьиц в листьях растений в результате чего транспирационный ток воды в растении уменьшается и соответственно должно происходить снижение интенсивности межклеточного транспорта воды в корне. Для подтверждения этого были проведены опыты с воздействием повышенной концентрации CO_2 на корни растений с удалённой листовой частью. Как видно из рисунка 6 при действии повышенной концентрацией CO_2 на сегменты корней в условиях нормобарии величина $D_{эфф}$ не изменяется. Более того, в экспериментах с повышением концентрации CO_2 до 1 % в течение первых 30 минут также происходит заметное снижение коэффициента диффузии воды и соответственно интенсивности межклеточного водного обмена (рис. 7). При этом дальнейшее повышение концентрации CO_2 до 10 % на том же образце не влияло на диффузионные параметры. Таким образом снижение интенсивности транспорта воды в интактных корнях кукурузы вследствие развития гипоксии при повышении концентрации CO_2 до 1-10 % не является преобладающим и скорее связано с устьичной регуляцией.

Скорость роста при увеличении концентрации углекислого газа в камере роста до 10 % также заметно снижалась, но полного ингибирования роста не происходило (рис. 8). Принимая во внимание длительность экспериментов по регистрации прироста корней (5-8 часов) можно утверждать, что основной вклад в величину прироста корней вносит рост растительных клеток растяжением. В свою очередь рост растяжением

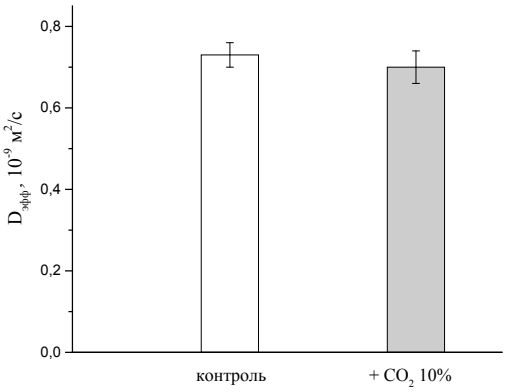


Рисунок 6. Влияние повышенной концентрации CO_2 в условиях нормобарии и гипербарии на средний эффективный коэффициент диффузии воды клеток сегментов корней кукурузы

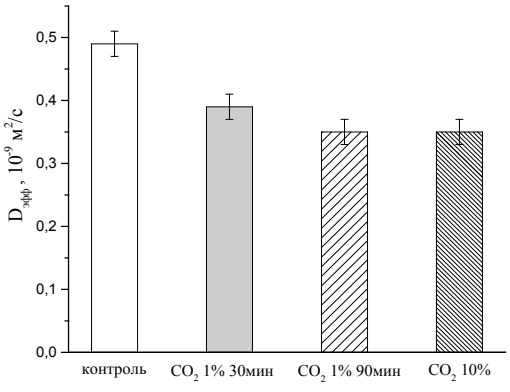


Рисунок 7. Средний эффективный коэффициент диффузии воды в клетках корней интакных растений кукурузы в контроле, через 30 и 90 минут после повышения концентрации CO_2 в листовой зоне растений до 1 % и при последующем повышении уровня CO_2 до 10 %

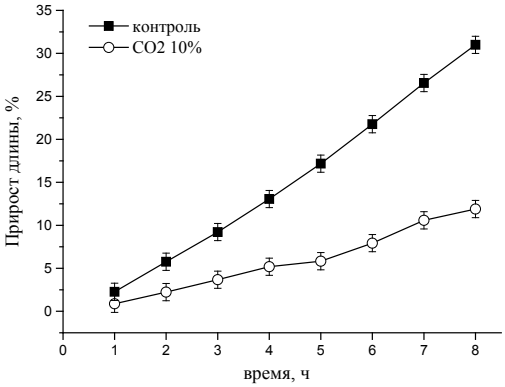


Рисунок 8. Прирост длины корней 4-х дневных проростков кукурузы в процентах к первоначальной длине, измеренный для контрольных растений и для растений, находящихся в условиях повышенной концентрацией CO_2 до 10 %

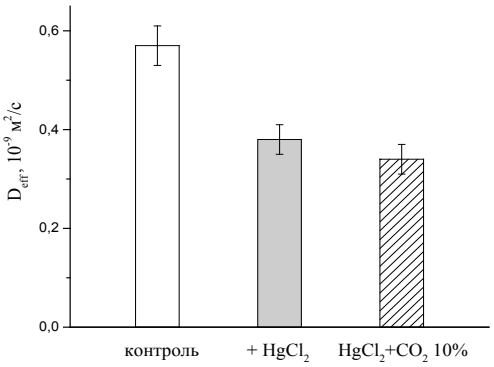


Рисунок 9. Средний эффективный коэффициент диффузии воды в клетках корней интакных растений кукурузы в контроле, после обработки корней раствором хлорида ртути ($HgCl_2$ 200 мкМоль/л) и при последующем повышении концентрации CO_2 в листовой зоне до 10 %

обеспечивается активным поступлением воды в растущую клетку. С этой точки зрения, данные по скорости роста корней, полученные в данной работе, достаточно хорошо коррелируют с результатами диффузионных экспериментов. Известно, что водные каналы аквапорины выполняют основную роль в модуляции гидравлической проводимости корней [19], что наводит на вопрос о вкладе трансмембранного переноса воды через аквапорины в снижении интенсивности межклеточного водного переноса в ответ на повышение концентрации CO_2 в листовой зоне растений. После предварительной обработки корней ингибитором аквапоринов хлоридом ртути в концентрации 200 мкМоль/л увеличение концентрации CO_2 не приводило к изменениям в диффузионном транспорте воды в корнях растений (рис. 9). Это свидетельствует об участии аквапоринов в изменении водной проводимости корней в ответ на повышение концентрации CO_2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные данные, полученные в данной работе, отчётливо демонстрируют чувствительность процессов роста и межклеточного переноса воды в корнях растений к изменению газового состава атмосферы. При уменьшении концентрации кислорода в листовой зоне растений, путём его замещения азотом или углекислым газом, наблюдается снижение интенсивности межклеточного транспорта воды и опосредованного им процесса роста корней растений кукурузы. При этом реакция на повышение углекислого газа более выраженная и имеет скорее регуляторный характер, связанный с реакцией устьиц на повышение концентрации CO_2. Аквапорины клеток корней также вовлечены в процесс снижения межклеточного водообмена. В дополнение к вышесказанному в работе продемонстрирована возможность исследования в динамике процессов роста и транспорта воды в корнях интактных растений при одновременном изменении концентрации газов атмосферного воздуха в наземной части, что представляет ценный методический инструмент для исследования взаимосвязи газообмена и водообмена в растениях.

Список литературы / References:

1. Залялов А.А., Газизов И.С. *Вода растений*. Казань: Фэн, 2013, 366 с. [Zalalov A.A., Gazizov I.S. *Voda rasteniy*. Kazan, Fen, 2013, 366 p. (In Russ.)]

2. Chaumont F., Tyerman S.D. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiology*, 2014, vol. 164, pp. 1600-1618.

3. Huang B., Xu Y. Cellular and Molecular Mechanisms for Elevated CO_2 – Regulation of Plant Growth and Stress Adaptation. *Crop Science*, 2015, vol. 55, pp. 1-20.

4. Zaghdoud Ch., Carvajal M., Ferchichi A., Carmen Martínez-Ballesta M. Water balance and N-metabolism in broccoli (Brassica oleracea L. var. Italica) plants depending on nitrogen source under salt stress and elevated CO_2. *Science of the Total Environment*, 2016, vol. 571, pp. 763-771.

5. Maurel C., Simonneau T., Sutka M. The significance of roots as hydraulic rheostats. *J. Exp. Bot.*, 2010, vol. 61, pp. 3191-3198.

6. Prior S.A., Runion G.B., Marble S.Ch., Rogers H.H., Gilliam Ch.H., Torbert H.A. A Review of Elevated Atmospheric CO_2 Effects on Plant Growth and Water Relations: Implications for Horticulture. *Hort Science*, 2011, vol. 46, no. 2, pp. 158-162.

7. Анисимов А.В. [и др.] Оснастка к исследованиям массопереноса под влиянием статического и динамического давления непосредственно в датчике градиентного ЯМР. *Датчики и системы*, 2012, т. 7, с. 64-67.

[Anisimov A.V., Suslov M.A., Zuykov V.A. Equipment to the study of mass transfer under the influence of static and dynamic pressure directly in the gradient NMR sensor. *Sensors and Systems*, 2012, vol. 7, pp. 64-67. (In Russ.)]

8. Анисимов А.В., Раткович С. *Транспорт воды в растениях. Исследование импульсным методом ЯМР*. М.: Наука, 1992, 144 с. [Anisimov A.V., Ratkovich S. *Water transport in plants. Investigation by pulsed NMR*. Moscow: Nauka, 1992, 144 p. (In Russ.)]

9. Valiullin R., Skirda V. Time dependent self-diffusion coefficient of molecules in porous media. *Journal of chemycal physics*, 2001, vol. 114, no. 1, pp. 452-458.

10. Crick F. Diffusion in embryogenesis. *Nature*, 1970, vol. 225, pp. 420-422.

11. Ehlert Ch., Maurel Ch., Tardieu F., Simonneau Th. Aquaporin-mediated reduction in maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transpiration. *Plant Physiol*., 2009, vol. 150, pp. 1093-1104.

12. Suslov M.A., Anisimov A.V. Pressure chamber with a viewport and magnet manipulators to study biological samples. *Instrumentation Science and Technology*, 2018, vol. 46, no. 4, pp. 426-434.

13. Saglio P.H., Rancillac M., Bruzan F., Pradet A. Critical Oxygen Pressure for Growth and Respiration of Excised and Intact Roots. *Plant Physiol*.,1984, vol. 76, pp. 151-154.

14. Kawasaki S-I., Tominaga J., Uehara N., Ueno M., Kawamitsu Y. Effects of Long-term Exposure to Different O2 Concentrations on Growth and Phytochemical Content in Red Leaf Lettuce. *Environ. Control Biol.*, 2015, vol. 53, no. 4, pp. 117-122.

15. Suyantohadi A., Kyoren T., Hariadi M. Effect of high consentrated dissolved oxygen on the plant growth in a deep hydroponic culture under a low temperature. *IFAC Proceedings Volumes*, 2010, vol. 43, no. 26, pp. 251-255.

16. Ho Q.T., Verlinden B.E., Verboven P., Vandewalle S., Nicolai B.M. A permeation-diffusion-reaction model of gas transport in cellular tissue of plant materials. *Journal of experimental botany*, 2006, vol. 57, no. 15, pp. 4215-4224.

17. Young J.J., Mehta S., Israelsson M., Godoski J., Grill E., Schroeder J.I. CO_2 signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca2+ -independent phase, and CO2 insensitivity of the gca2 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, pp. 7506-7511.

18. Lake J.A., Woodward F.I., Quick W.P. Long-distance CO2 signaling in plants. *J. Exp. Bot.*, 2002, vol. 53, pp. 183-193.

19. Li G., Santoni V., Maurel Ch. Plant aquaporins: roles in plant physology. *Biochimica et biophysica acta*, 2014, vol. 1840, pp. 1574-1582.

DYNAMICS OF GROWTH AND INTERCELLULAR WATER TRANSPORT IN INTACT ZEA MAIZE PLANTS UNDER CHANGE OF THE GAS COMPOSITION OF AIR

Suslov M.A., Anisimov A.V.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS

Lobachevskogo st., 2/31, Kazan, 420111, Russia; e-mail: makscom87@mail.ru

Abstract. In this work the effect of the gas composition of the air on the dynamics of growth and intercellular transport of water in intact maize roots was studied using the spin-echo NMR method. The original methodical and technical approach, allowing to register the parameters of water transport and the growth rate in plants, directly under change of the concentration of air gases was used in the present work. It was shown that the processes of water transport and plant growth are more sensitive to decrease of oxygen concentration when it is replaced by nitrogen and carbon dioxide. Under conditions of oxygen deficiency both the growth rate and the intercellular transport of water in the roots was decreased. In this case the reaction of the water transport system of plant roots to elevated concentration of CO_2 is more pronounced in comparison with the increase of the nitrogen concentration, which indicates the predominant regulatory role of carbon dioxide in the processes of gas exchange and water exchange in plants. An increase of the oxygen concentration in the atmosphere up to 60% did not lead to appreciable changes in the growth rate and intercellular transport of water in the roots.

Key words: *nuclear magnetic resonance, intercellular transport of water, plant growth, concentration of atmospheric gases.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЯЗКОУПРУГИХ СВОЙСТВ НУКЛЕОПЛАЗМЫ ООЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА

Сырчина М.С., Залесский А.Д., Осыченко А.А., Астафьев А.А., Айбуш А.В., Надточенко В.Н.

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова (ИХФ РАН)

ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: wrongclue@gmail.com

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. В настоящем исследовании демонстрируется новый малоинвазивный метод изучения вязкоупругих свойств надмолекулярных комплексов клетки (хроматина, ядрышка) с применением оптического лазерного захвата. В качестве объекта исследования были выбраны ооциты мыши, в связи с тем, что их биохимия и внутриклеточная организация хорошо изучена, а ядро и ядрышко имеют крупные размеры (10 мкм). Ядрышко используется в качестве «живого» микрозонда, а с помощью оптического захвата вызываем возмущение в системе ядрышко-хроматин. Полученные времена релаксации ядрышка при его смещении оптическим пинцетом в разных направлениях указывают на анизотропные свойства нуклеоплазмы. Кроме того, использование оптического захвата на живых системах позволяет визуализировать взаимодействие ядерных и цитоплазматических структур, не прибегая к цитохимическим методам.

Ключевые слова: *оптический захват, ооцит мыши, микрореология, мягкие материалы, ядрышко, биополимеры.*

ВВЕДЕНИЕ

Механические процессы, протекающие в клетках, наряду с молекулярными превращениями, играют колоссальную роль в реализации основных биологических процессов: эмбриогенезе, пролиферации, клеточной дифференцировке, генной экспрессии, адгезии, канцерогенезе [1-4]. На сегодняшний день широко распространены методы исследования клеточной механики в качестве маркера состояния отдельных живых клеток и потенциальных патологических процессов, протекающих в них. К ним относятся: атомно-силовая микроскопия, применение микропипеток, микроканалов, магнитной сепарации клеток. Основными преимуществами данных методов является возможность работы с живыми клетками и минимизации эффектов, связанных с химической модификацией клеточных структур, которые могут возникать, например, при работе с флуоресцентными красителями, флуоресцентными белками и т. д. Однако, существенным ограничением данных методов является их инвазивность. В ходе работы с биологическим материалом могут возникать механические повреждения клетки (перфорации при внедрении в клетку микросфер или повреждение поверхности клетки АФМ-зондом) [5-8].

Одной из наиболее прецизионных и малоинвазивных техник является метод оптических лазерных ловушек (оптический пинцет), позволяющий захватывать и манипулировать не только отдельными клетками, но и клеточными структурами – изолированными биополимерами, надмолекулярными комплексами и органеллами. При помощи оптического пинцета можно воздействовать на объекты размером от 0,01 до 10 мкм, а также прикладывать к объекту силу от одного до нескольких сотен пиконьютонов.

Оптический пинцет активно применяется в различных методиках, связанных с исследованием вязкоупругих свойств нуклеиновых кислот. Накопление знаний о микромеханических характеристиках ДНК/РНК – белковых комплексов чрезвычайно важно для более детального понимания механизмов реализации информации внутри клетки. Традиционно в подобных экспериментах осуществляют выделение изолированных молекул нуклеиновых кислот. В результате экспериментальная система значительно упрощается и получаемые результаты могут существенно отличаться от реальных процессов и эффектов, возникающих в клетке *in vivo* [9-12].

В ходе созревания ооциты претерпевают структурные и биохимические превращения. Рост ооцита и переход к первому мейотическому делению сопряжены с реорганизацией хроматина. Материал ядра подвергается модификациям – хроматин становится более компактным и транскрипционно неактивным, окружает плотным кольцом ядрышко. В связи с этим выделяют три основных конфигурации ядер ооцитов: NSN – «non-surrounded nucleolus» – хроматин диффузно располагается в кариоплазме, SN – «surrounded nucleolus» – хроматин кольцом окружает ядрышко, pSN – «partly surrounded nucleolus» – хроматин частично окружает ядрышко (рис. 1). Все три состояния различаются по уровню транскрипционной активности ядра и, как следствие, по потенциалу к успешному завершению мейоза и оплодотворению [13, 14].

Понимание механизмов взаимодействия компонентов ядра ооцитов может быть существенным для оценки потенциала ооцита к завершению мейоза, оплодотворению и дальнейшему успешному развитию.

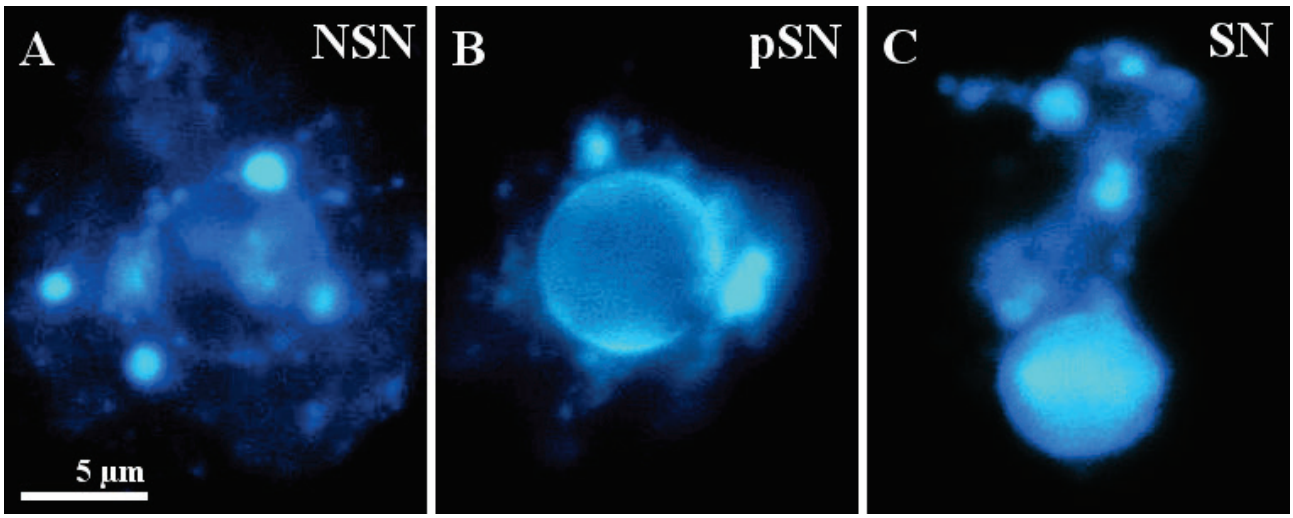


Рисунок 1. Основные типы конфигурации хроматина в ядре; A - хроматин диффузно располагается в кариоплазме; B - хроматин частично окружает ядрышко; C- хроматин кольцом окружает ядрышко. Ядрышко на изображении представлено светящимся кругом

В текущем исследовании мы воздействуем на систему ядрышко-хроматин, интегрированную в термодинамически неравновесную систему клетки – ооцита мыши, таким образом ДНК-белковый комплекс испытывает на себе действие ещё и со стороны цитоплазматических структур, в частности цитоскелета. Мы предлагаем новый метод, основанный на применении оптического захвата, для изучения взаимодействия ядрышка и хроматина в живых ооцитах мыши. Анализ динамики движения ядрышка внутри нуклеоплазмы позволит оценить вязкоупругие свойства хроматина и обнаружить особенности его взаимодействия с ядрышком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы мыши возрастом 6-9 недель линии C57BL/CBA. Мышам внутрибрюшинно инъецировали 7,5 МЕ фолликулостимулирующий гормон ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы). Через 48 часов ооциты извлекались из яичников путём пункции фолликулов в среде M2, очищались от кумулюсных клеток при помощи гиалуронидазы. Для выявления структуры хроматина был использован краситель Hoechst 33342, окрашивание производилось в течение 15 минут, концентрация красителя 1 мг/мл. Далее ооциты по одному переносили в каплю среды M2 объемом 30 мкл на покровное стекло. Работа осуществлялась на нагревательном столике, температура 37 °C.

Оптический захват ЯПТ осуществляли непрерывным излучением из титан-сапфирового лазера на длине волны 790 нм. Излучение лазера заводилось в микроскоп и далее фокусировалось в ооцит объективом 60x0,7 NA. Мощность излучения в фокусе объектива составляла 280 мВт, что примерно соответствовало максимальной силе в 10 пн прикладываемой к ядрышку, которая была измерена в микрофлюидной системе. Смещение ЯПТ с помощью оптического захвата и его релаксация после выключения захвата записывались на видео с помощью высокоскоростной камеры. Смещения ЯПТ производились последовательно в разных направлениях с интервалом в несколько десятков секунд, что позволяло системе полностью релаксировать. Сразу после окончания экспериментов со смещением ЯПТ регистрировали конфигурацию конденсации хроматина в ядре с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Hoechst 33342. Полученные видеоизображения обрабатывали с помощью специально написанного программного обеспечения, которое позволяло зафиксировать положение центра ооцита и ЯПТ и с субдифракционным разрешением детектировать смещение ЯПТ с помощью математического алгоритма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования динамики и траектории движения ядрышка в нуклеоплазме живого ооцита мыши, использовался оптический захват, причём ядрышко выполняло роль микрозонда. При включении лазера, ядрышко затягивалось в оптическую ловушку и его можно было перемещать в пространстве нуклеоплазмы. Смещения ядрышка производились в разных направлениях. После выключения захвата ядрышко релаксировало, в некоторых случаях не возвращаясь в исходное положение; затем выявляли конфигурацию ядра ооцита при помощи флуоресцентной микроскопии, детектируя свечение и распределение хроматина в ядре.

При помощи специально разработанного программного обеспечения для каждого ооцита были получены следующие данные: абсолютное время в секундах, относительное время в секундах, позиция X центра ядрышка, позиция Y центра ядрышка. При обработке полученных видеоизображений для каждого ооцита (всего было исследовано 70 ооцитов) были получены данные о времени релаксации ядрышка после выключения оптической ловушки (рис. 2).

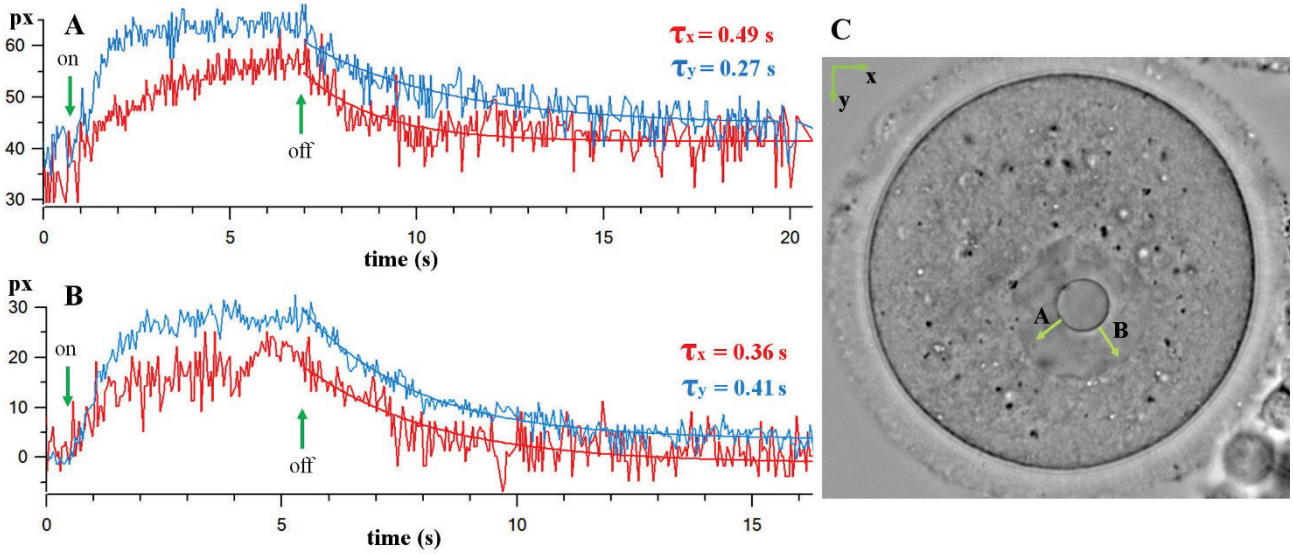


Рисунок 2. На графиках показано изменение координат ядрышка по осям X и Y (пиксели) во времени (секунды), а также соответствующие времена релаксации τ_x и τ_y. Зелёными стрелками на рисунках A и B обозначены моменты включения (on) и выключения (off) оптической ловушки. Стрелками на рисунке C обозначены направления смещения ядрышка

Последовательные смещения ядрышка в различных направлениях позволили выявить анизотропный характер материала ядра, о чем свидетельствуют характерные времена релаксации. Это может свидетельствовать о гетерогенности вязкоупругих свойств плазмы ядра. Такие эффекты наблюдались преимущественно в ооцитах с ядрами, имеющими pSN и NSN конфигурацию. В случае с ооцитами, имеющими SN конфигурацию, наблюдалась следующая картина: ядрышко, как правило, оказывалось малоподвижным, закреплённым на ядерной мембране, в результате чего выявлялась лишь его деформация. Кроме того, возмущение ядрышка приводило к смещению мембраны ядра и цитоплазмы, что лишний раз доказывает связь структур ядра с компонентами цитоскелета цитозоля без применения дополнительных цитохимических методов. Анизотропные свойства нуклеоплазмы можно связать с тем, что ооцит, являясь термодинамически неравновесной системой, в каждый отдельный момент времени совершает морфогенетические превращения – распределение хроматина изменяется от условно «гомогенного» к формированию отдельных компактных хромосом. Аналогичная ситуация наблюдается с цитоскелетом. В ранней профазе распределение микротрубочек более гомогенно, они образуют плотную равномерную цитоплазматическую сеть. По мере развития ооцита формируются крупные центры, состоящие из тубулина и перицентрина, располагающиеся преимущественно вокруг ядра [15]. Установление более конкретных причин возникновения анизотропии требует дополнительных исследований, так как оогенез представляет собой сложный, многофакторный процесс и характер смещения ядрышка определяется своими собственными свойствами и свойствами микроокружения.

Таким образом, данным экспериментом мы проиллюстрировали, что движение ядрышка в нуклеоплазме может быть исследовано при помощи оптического захвата. Времена релаксации ядрышка при действии оптического пинцета указывают на анизотропные свойства материала ядра; использование ядрышка в качестве микрозонда делает данную методику малоинвазивной. Кроме того, использование оптического захвата позволяет визуализировать взаимодействие ядерных и цитоплазматических структур. Полученные сведения о динамике движения ядрышка в живых ооцитах могут послужить основой для новой классификации ооцитов и использоваться для предопределения их потенциала к успешному завершению мейотического созревания и оплодотворения.

Работа частично выполнена за счет субсидии, выделенной ИХФ РАН на выполнение государственного задания, тема 0082-2018-0005 (код АААА–А18–118020690203–8) в части флуоресцентной микроскопии с использованием оборудования ЦКП ИХФ РАН № 506694. Работа по исследованию вязкоупругих свойств нуклеоплазмы с помощью оптического захвата выполнена за счет гранта РФФИ 18-33-01080.

Список литературы / References:

1. Stamenovic D., Wang N. Cellular Response to Mechanical Stress – Invited Review: Engineering Approaches to Cytoskeletal Mechanics. *Journal of Applied Physiology*, 2000, vol. 89, pp. 2085-2090.

2. Vincent J.-P., Fletcher A.G., Baena-Lopez L.A. Mechanisms and Mechanics of Cell Competition in Epithelia. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2013, vol. 14, no. 9, pp. 581-591.

3. Chen C.S., Tan J., Tien J. Mechanotransduction at Cell-Matrix and Cell-Cell Contacts. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004, vol. 6, no. 1, pp. 275-302.

4. Tapley E.C., Starr D.A. Connecting the Nucleus to the Cytoskeleton by Sun-Kash Bridges across the Nuclear Envelope. *Current opinion in cell biology*, 2013, vol. 25, no. 1, pp. 57-62.

5. Guo M., Ehrlicher A.J., Mahammad S., Fabich H., Jensen M.H., Moore J.R., Fredberg J.J., Goldman R.D., Weitz D.A. The Role of Vimentin Intermediate Filaments in Cortical and Cytoplasmic Mechanics. *Biophysical Journal*, 2013, vol. 105, no. 7, pp. 1562-1568.

6. Haase K., Pelling A.E. Investigating Cell Mechanics with Atomic Force Microscopy. *Journal of the Royal Society Interface*, 2015, vol. 12, no. 104, pp. 20140970.

7. Guevorkian K., Maître J.L. Chapter 10 – Micropipette Aspiration: A unique Tool for Exploring Cell and Tissue Mechanics *in vivo*. In *Methods in Cell Biology*, Lecuit T., Ed. Academic Press: 2017, vol. 139, pp. 187-201.

8. Hu S., Liu G., Chen W., Li X., Lu W., Lam R.H.W., Fu J. Multiparametric Biomechanical and Biochemical Phenotypic Profiling of Single Cancer Cells Using an Elasticity Microcytometer. *Small*, 2016, vol. 12, no. 17, pp. 2300-2311.

9. Fisher J.K., Ballenger M., O'Brien E.T., Haase J., Superfine R., Bloom K. DNA Relaxation Dynamics as a Probe for the Intracellular Environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, no. 23, pp. 9250-9255.

10. Jiang Y., Matsumoto Y., Hosokawa Y., Masuhara H., Oh I. Trapping and Manipulation of a Single Micro-Object in Solution with Femtosecond Laser-Induced Mechanical Force. *Applied Physics Letters*, 2007, vol. 90, no. 6, pp. 061107.

11. Lang M.J., Fordyce P.M., Block S.M. Combined Optical Trapping and Single-Molecule Fluorescence. *Journal of biology*, 2003, vol. 2, no. 1, pp. 6.

12. Neuman K.C., Lionnet T., Allemand J.F. Single-Molecule Micromanipulation Techniques. *Annual Review of Materials Research*, 2007, vol. 37, no. 1, pp. 33-67.

13. Tan J.-H., Wang H.-L., Sun X.-S., Liu Y., Sui H.-S., Zhang J. Chromatin Configurations in the Germinal Vesicle of Mammalian Oocytes. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2009, vol. 15, no. 1, pp. 1-9.

14. Ma J.-Y., Li M., Luo Y.-B., Song S., Tian D., Yang J., Zhang B., Hou Y., Schatten H., Liu Z., Sun Q.-Y. Maternal Factors Required for Oocyte Developmental Competence in Mice: Transcriptome Analysis of Non-Surrounded Nucleolus (Nsn) and Surrounded Nucleolus (Sn) Oocytes. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 12, pp. 1928-1938.

15. Schuh M., Ellenberg J. Self-Organization of Mtocs Replaces Centrosome Function During Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell*, 2007, vol. 130, no. 3, pp. 484-498.

INVESTIGATING VISCOELASTIC PROPERTIES OF MAMMALIAN OOCYTES NUCLEOPLASM WITH OPTICAL TRAPPING

Syrchina M.S., Zalesskii A.D., Osychenko A.A., Astafiev A.A., Aybush A.V., Nadtochenko V.A

Semenov institute of chemical physics (ICP RAS)

Kosygina st., 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: wrongclue@gmail.com

Abstract. We suggest a new non-invasive method, based on applying of optical trapping for viscoelastic properties investigation of cellular supramolecular complexes (chromatin, nucleolus). As a model object, we used mice oocytes because of their well-known biochemistry, intracellular organization and large size of nuclei (10 μm). Nucleoli were supposed to be natural microspheres, so it was possible to catch them by optical tweezers and create deformations of nuclei matter. Based on our data, measured relaxation time of nucleoli could be an indicator of spatial viscoelastic properties changes. Also, optical trapping is a powerful tool for visualization of interactions between nucleus and cytoplasm.

Key words: *optical trapping, mouse oocyte, microrheology, soft matter, nucleolus, biopolymers*

ВЛИЯНИЕ ДЛИНЫ УГЛЕВОДОРОДНЫХ ЦЕПЕЙ МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ, ЛАТЕРАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ДЛЯ КИСЛОРОДА

Гуськова Р.А., Васильев Н.С., Локтюшкин А.В., Иванов И.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: ivanov36@mail.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2018.

Аннотация. С помощью сканирующего электрохимического микроскопа (СЭХМ) с инвертированным открытым платиновым электродом (ИОПЭ), интегрированного с ванной Ленгмюра, исследовали влияние длинноцепочечных углеводородов на проницаемость мембран для O_2. Установлено, что проницаемость мембран из длинноцепочечных жирных кислот (C_{18} – стеариновая или C_{20} – арахиновая) резко снижается при возрастании поверхностного давления в диапазоне 20-50 мН/м. При добавлении холестерина к этим мембранам (до 10 %) влияние поверхностного давления на скорость переноса O_2 ингибируется. Проницаемость мембран из липидов с более короткими цепями (C_{16} и менее) остается высокой независимо от величины латерального давления. Физиологическая роль обнаруженных явлений обсуждается в связи с особенностями газообмена O_2 через мембрану эритроцитов в микрокапиллярах кровяного русла. Рассматривается формирование вытянутой формы клетки в микрокапилляре, увеличение площади мембраны клетки, снижение поверхностного натяжения в мембране, минимизация зазора между мембраной эритроцита и стенками микрокапилляра, движение клетки вдоль капилляра, скорость и причины возвращения клетки к нормальной двояковогнутой форме.

Ключевые слова: *проницаемость липидных мембран для кислорода, длинноцепочечные липиды, латеральное давление, холестерин, СЭХМ.*

Аэробным животным и человеку для обеспечения нормальной жизнедеятельности необходим постоянный приток молекулярного кислорода от легких к клеткам организма. Кислород сравнительно плохо растворяется в водных средах; при физиологических температурах его равновесная с воздухом концентрация не превышает 250 мкМ. Такого количества O_2 в сосудистом русле недостаточно для обеспечения потребностей живых организмов в кислороде. Резкое увеличение кислородной емкости циркулирующей жидкости (крови) у животных и человека обеспечивают специализированные клетки крови – эритроциты. Суммарный объем этих клеток в крови человека (гематокрит) в норме лишь чуть меньше 50 % от общего объема крови. Эритроциты способны концентрировать O_2 в цитоплазме до 20-22 мМ в результате быстрого обратимого связывания O_2 с гемоглобином. За время круговорота крови в организме человека (продолжительностью 23-25 с), интенсивный трансмембранный перенос кислорода происходит, когда эритроцит протискивается через микрокапилляры кровного русла. В тканевых капиллярах мышц за время менее 1 с эритроцит человека в норме отдает окружающим тканям 5-7 мМ O_2. Пополнение эритроцита кислородом в капиллярах легких происходит еще быстрее, примерно за четверть секунды [1, 2]. Столь высокая интенсивность этих реверсивных потоков означает, что в нормальных условиях мембрана эритроцитов легко проницаема для кислорода.

Механизмы, обеспечивающие высокую проницаемость мембран эритроцитов для кислорода, однако, все еще недостаточно ясны. Существуют две основные точки зрения на причины высокой проницаемости мембран эритроцитов для кислорода. Первая, в настоящее время наиболее распространенная, связывает высокую скорость проникновения O_2 в клетку через плазматическую мембрану эритроцита с высокой диффузионной проницаемостью липидного бислоя мембраны для O_2 (базальная проницаемость). Согласно второй – полагают, что базальная диффузия O_2 через липидный бислой идет с малой скоростью, а высокую проницаемость мембраны эритроцита для O_2 обеспечивают белковые поры (каналы) плазматической мембраны клетки.

В основе первой точки зрения лежат главным образом результаты серии исследований с применением встроенных в мембрану O_2-чувствительных флуоресцентных или спиновых зондов. В этих работах на основании зависимостей от кислорода квантовых выходов флуоресценции или характера изменения спектров парамагнитных зондов в мембранах, авторы вычислили диффузионную подвижность O_2 в ближайшем окружении зондов и отсюда рассчитали величину коэффициента проницаемости липидного бислоя для O_2 (0,1-0,3 м/с). Отсюда следует, что проницаемость липидного бислоя для кислорода соизмерима с проницаемостью слоя воды аналогичной толщины. [3-6]. Проницаемость мембран эритроцитов для O_2 исследовали также в серии работ, выполненных методом остановленного потока (быстрого перемешивания). Метод позволяет регистрировать миллисекундную кинетику переноса кислорода через мембрану эритроцитов по изменению во времени соотношения окси- и дезоксигемоглобина в клетке после быстрого перемешивания суспензии дезокси-эритроцитов с окси-средой [7]. Оказалось, что скорость поглощения O_2 дезокси-эритроцитами не зависит от скорости химической реакции взаимодействия O_2 с гемоглобином в клетке (константа скорости этой реакции $\approx 3 \cdot 10^6$ $M^{-1} \cdot c^{-1}$), а определяется интенсивностью трансмембранного диффузионного поступления O_2 из внешней среды в цитоплазму. При этом скорость потребления O_2 клеткой превышает скорость его диффузионного поступления из внешнего объема среды инкубации. В результате в процессе оксигенации у поверхности клетки

концентрация O_2 снижается, вследствие чего формируется так называемый неперемешиваемый слой (НС). Диффузионное сопротивление данного слоя определяется выражением $R_{нс} = \delta/D$, где D – коэффициент диффузии O_2 в воде ($D = 2{,}1 \cdot 10^{-5}$ см^2/с при 20 °С), а δ – толщина НС. Расчеты показали, что в разбавленных суспензиях клеток диффузионное сопротивление неперемешиваемого слоя значительно больше сопротивления мембраны. Откуда следует, что мембрана фактически не влияет на скорость поступления кислорода в клетку [8, 9]. Этот вывод и результаты, полученные с помощью флуоресцентных и парамагнитных зондов, казались столь убедительными и исчерпывающими, что дальнейшие исследования роли мембраны в кислородном газообмене эритроцитов с помощью указанных методов были фактически свернуты более 30 лет тому назад. Постепенно дискуссионные детали и выводы проведенных исследований потускнели; сохранился лишь устойчивый постулат, что «мембрана фактически не влияет на скорость поступления кислорода в клетку». Между тем, утверждение о высокой базальной диффузионной проницаемости липидного бислоя для кислорода плохо согласуется с рядом важных фактов и соображений:

- представления о высокой диффузионной подвижности кислорода в липидах мембран плохо согласуются с высокой вязкостью липидного бислоя мембран, которая более чем на два порядка превышает вязкость водной фазы [10-12]. В соответствии с законами диффузии следует ожидать, что величины молекулярной подвижности кислорода в липидах мембран будут также значительно ниже, чем в воде;

- участие неперемешиваемых слоев в процессе оксигенации одиночных эритроцитов в разбавленных модельных суспензиях понятно. Однако в микрокапиллярах кровяного русла *in vivo* газообмен протекает в совершенно иных условиях, где роль этих слоев вызывает серьезные сомнения. Наиболее интенсивный газообмен идет, когда эритроцит проходит через микрокапилляры мышц и альвеол, диаметр которых 2-3 мкм. Диаметр же большого сечения двояковогнутого эритроцита в норме составляет 6-8 мкм. Протиснуться в столь узкий сосуд эритроциту позволяет его исключительная пластичность. При этом минимальный зазор между внутренней стенкой капилляра и мембраной эритроцита, а также непрерывное поступательное продвижение клетки вдоль капилляра обеспечивают высокую эффективность газообмена. То есть газообмен идет в условиях, когда возможность формирования неперемешиваемых слоев минимизирована;

- в последнее время интенсивно исследуются и обсуждаются возможности ряда малых незаряженных молекул и газов (CO_2, NO, NH_3, H_2O, H_2O_2) проникать через биологические мембраны при участии белковых пор и каналов [13-15]. Высказывается возможность участия белковых каналов и в обеспечении высокой проницаемости мембран эритроцитов человека и для O_2. Наиболее вероятными кандидатами на роль кислородной поры являются белки аквапорин 1 (AQP1) и белок резус фактора Rh, которые в относительно высоких количествах содержится в мембране эритроцитов [16]. Очевидно, что при высокой базальной проницаемости O_2 через липидный бислой мембран, функция белковых каналов в мембране теряет физический смысл,

- недавние прямые измерения диффузионных потоков O_2 через липидные мембраны с помощью специальных методов, в частности, сканирующего электрохимического микроскопа (СЭХМ) показали, что коэффициент трансмембранной проницаемости монослойных липидных мембран для O_2 $P_m \approx 10^{-3}$-10^{-4} м/с, то есть на 2-3 порядка ниже, чем у слоя воды аналогичной толщины [17]. Близкие величины коэффициента проницаемости липидных мембран были получены независимым методом и для CO_2 – другого респираторного газа, близкого по физико-химическим свойствам к O_2 [18].

Таким образом, вопрос о том, липидный бислой, белковые поры, а возможно и их комбинация определяют проницаемость мембран эритроцитов для O_2, все ещё окончательно не решен и нуждается в дополнительных исследованиях.

Основной концепцией трансмембранного переноса простых газов (кислорода), других малых частиц и ионов через биологические мембраны до последнего времени является модель растворения-диффузии, известная как правило Мейера-Овертона. Эта концепция позволяет представить плотность трансмембранного потока J в стационарных условиях как его интенсивность в липидном бислое, используя диффузионный закон Фика и вычисляя разность концентраций частиц в бислое от одного его края до другого на основании коэффициента распределения частиц между углеводородной (липидной) фазой и водой:

$$J = -D_m \gamma \Delta C/h = -P_m \Delta C \text{ при } P_m = D_m \gamma/h,$$

где P_m – коэффициент проницаемости липидного бислоя мембран для частицы; D_m – коэффициент диффузии частицы в липидном бислое вдоль оси x, нормальной к поверхности мембраны; h – толщина бислоя; γ – коэффициент распределения частиц между липидным слоем мембраны и водной фазой вблизи мембраны ($\gamma = C'/C$); $\Delta C = C_1 - C_2$ – разность концентраций частицы в водных фазах с двух сторон мембраны; $\Delta C' = \gamma C_1 - \gamma C_2 = \gamma \Delta C$ – разность концентраций кислорода в липидном слое мембраны от одного его края до другого.

Молекула кислорода не заряжена и не полярна; ее постоянный дипольный момент практически равен нулю, низка поляризуемость $\alpha \approx 1{,}57 \cdot 10^{-24}$ см^3 и достаточно высок потенциал ионизации $I \approx 12{,}2$ эВ. В обычных условиях кислород слабо взаимодействует как с водой, так и с неполярными углеводородами. В результате он сравнительно плохо растворяется в этих средах. В равновесии при нормальных условиях коэффициент распределения кислорода в двухфазной системе длинноцепочечные углеводороды/вода, составляет ~10. Эту

величину часто принимают в качестве коэффициента распределения кислорода между липидами клеточных мембран и водной фазой. Между тем, такое заключение представляется недостаточно корректным.

Растворимость кислорода в псевдофазе, образованной плотно упакованными углеводородными цепями жирнокислотных остатков липидов в мембранных, должна быть ниже, чем в неструктурированных объемных фазах (маслах), поскольку последние содержат сравнительно много межмолекулярных свободных объемов (дефектов). Эти представления согласуются с результатами молекулярно-динамических расчетов, из которых следует, что кислород локализуется в мембране преимущественно в зоне полярных головок липидов, содержащей повышенное число дефектов, а также в разупорядоченном центре бислоя, где контактируют терминальные группы противолежащих углеводородных цепей [19]. В зонах же, образованных плотно упакованными участками жирнокислотных цепей в мембранах, число дефектов и концентрация растворенного кислорода существенно ниже. Таким образом, липидная зона мембран гетерогенна (по глубине) по способности растворять кислород, а экспериментально найденные величины коэффициентов распределения представляют собой в той или иной степени точности усредненные значения. К сожалению, надежное определение коэффициента распределения кислорода в системе мембранные липиды/вода чрезвычайно сложная и все еще до конца не решенная задача. Появляющиеся в литературе новые оценки величин коэффициентов распределения кислорода в системе липиды мембран/вода постепенно снижаются до 4-3 и даже 2. В дальнейшем для простоты мы будем использовать достаточно реальное допущение о том, что коэффициент распределения кислорода в системе липиды мембран/вода близок к единице ($\gamma \sim 1$). То есть будем полагать, что в равновесии концентрации растворенного кислорода в водной фазе, окружающей мембраны ($C(O_2)$), и в липидном бислое мембран ($C'(O_2)$), близки ($C'(O_2)/C(O_2) = \gamma \approx 1$) Отсюда следует, что приложенный к объемным водным фазам с двух сторон мембраны градиент концентрации кислорода практически целиком падает внутри липидного слоя мембран. Это означает, что плотность упаковки липидной зоны мембран, ее состав и действие других факторов, модифицирующих диффузионные свойства бислоя, прямо влияют на интенсивность трансмембранных потоков кислорода.

Сравнительно недавно для исследования базальной диффузионной проницаемости липидных пленок был разработан новый метод и в двух-трех лабораториях сконструированы соответствующие установки – сканирующие электрохимические микроскопы с инвертированными открытыми платиновыми/ртутными электродами. Микроскопы интегрированы с ванной Ленгмюра, оборудованной весами Вильгельми. В целом приборный комплекс позволяет получать монослойные мембраны из липидов заданного состава на границе раздела фаз воздух/вода, создавать и контролировать поверхностное давление в пленке, измерять плотность трансмембранного диффузионного тока из газовой фазы к электроду через липидный монослой и микрослой водной фазы контролируемой толщины от поверхности раздела фаз (мембрана/вода) до электрода. Важно, что в этих условиях исключаются ошибки, связанные с наличием неперемешиваемых слоев воды у поверхности мембраны. Применяемые в нашей лаборатории модификация условий экспериментов и алгоритм обработки результатов позволяют полностью учитывать градиент концентрации кислорода между газовой фазой и поверхностью работающего электрода (рис. 1). Это позволяет путем сравнения проницаемости мембраны с диффузионной проницаемостью для O_2 слоя воды известной толщины, прямо вычислять коэффициенты проницаемости мембран для O_2 в заданных условиях [17].

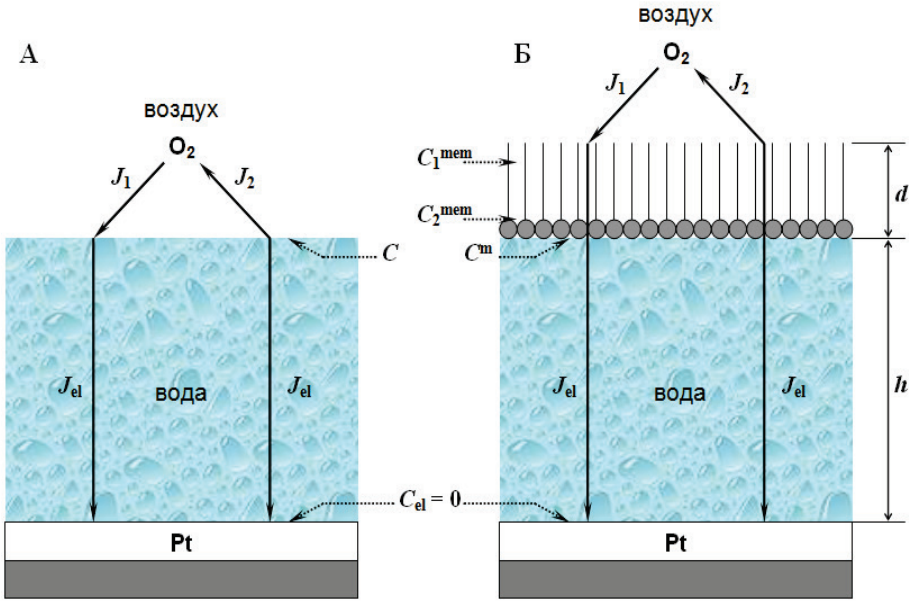


Рисунок 1. Схема диффузионных потоков O_2 для чистой границы раздела фаз воздух/вода (А) и в присутствии липидной монослойной мембраны (Б). J_1 – поток O_2 из воздуха к межфазной границе, J_2 – поток от границы в воздушную фазу, J_{el} – поток O2 от межфазной границы к поверхности электрода

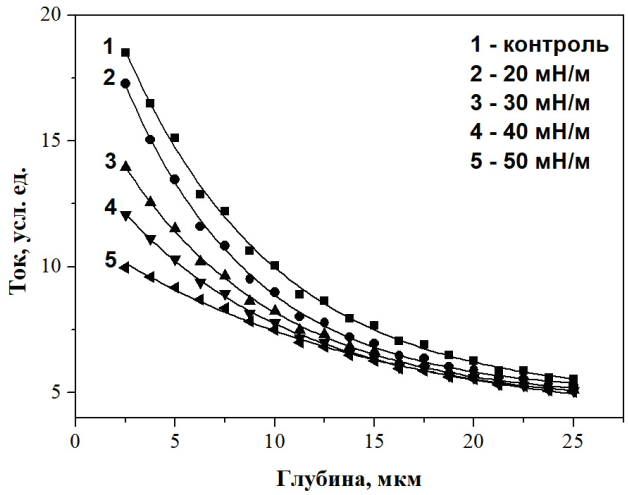


Рисунок 2. Зависимости величины диффузионного тока от глубины погружения электрода для чистой поверхности воды (кривая 1) и при нанесении на поверхность воды монослоев арахиновой кислоты с различным величинами поверхностного давления (кривые 2-5)

Результаты, полученные методом СЭХМ, показали, что проницаемость для O_2 монослойных мембран достаточно велика и слабо зависит от поверхностного давления в мембранах, собранных из углеводородных цепей, длина которых менее C_{16}. Наиболее четко это продемонстрировано на примере спиртов. Влияние поверхностного давления на проницаемость для O_2 монослоев длинноцепочечных спиртов быстро нарастает в ряду $C_{16} < C_{18} < C_{20}$. Близкий характер зависимости проницаемости от давления мы получили и для длинноцепочечных жирных кислот. На рисунке 2 представлена эта зависимость на примере арахиновой кислоты C_{20}.

Из приведенных данных видно, что при поверхностном давлении в слое 30 мН/м, что примерно соответствует латеральному давлению в клеточных мембранах, коэффициент проницаемости монослоя арахиновой кислоты равен $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ м/с. Эта величина более чем на два порядка меньше, чем при минимальных значениях латерального давления в монослойной мембране. Холестерин при концентрации не выше 10 % при давлении 30 мН/м снижает тормозящее действие латерального давления на проницаемость монослоя для кислорода. Действие доксилстеарата, фосфатидной кислоты и дифитаноилфосфатидилхолина на кислородный транспорт через арахиновый монослой также требует учета роли длины углеводородных цепей липидов мембран.

Обнаруженная зависимость диффузионного сопротивления липидных монослоев из длинноцепочечных липидов от латерального давления позволяет по-новому интерпретировать низкое диффузионное сопротивление мембран эритроцитов в фазе интенсивного трансмембранного переноса кислорода *in vivo*. По предварительным оценкам вытянутая форма эритроцита в микрокапилляре требует почти удвоения площади мембраны клетки. Этот энергозависимый процесс может осуществляться за счет гидромеханической энергии кровотока. В результате растяжения мембраны снижается ее диффузионное сопротивление трансмембранному переносу кислорода. Клетка протискивается с минимальным зазором у стенки капилляра. При этом она непрерывно набегает на «свежий» участок, уравновешенный после прохождения предыдущего эритроцита. Важно, что длинноцепочечные жирнокислотные остатки за счет вязкоупругих свойств участвуют также в быстром восстановлении двояковогнутой формы нормоцита.

Список литературы / References:

1. West J.B. *Respiratory physiology – The essentials.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, 192 p.

2. Endeward V., Musa-Aziz R., Cooper G.J., Chen L.M., Pelletier M.F., Virkki L.V., Supuran C.T., King L.S., Boron W.F., Gros G. Evidence that aquaporin 1 is a major pathway for CO_2 transport across the human erythrocyte membrane. *FASEB J.*, 2006, vol. 20, pp. 1974-1981.

3. Fischkoff S., Vanderkooi J.M. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene. *J. Gen. Physiol.*, 1975, vol. 65, pp. 663-676.

4. Subczynski W.K., Hopwood L.E., Hyde J.S. Is the mammalian cell plasma membrane a barrier to oxygen transport? *J. Gen. Physiol.*, 1992, vol. 100, pp. 69-87.

5. Ligeza A., Tikhonov A.N., Hyde J.S., Subczynski W.K. Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1365, pp. 453-463.

6. Subczynski W.K., Wisniewska A. Physical properties of lipid bilayer membranes: relevance to membrane biological functions. *Acta Biochim. Pol.*, 2000, vol. 47, pp. 613-625.

7. Coin J.T., Olson J.S. The rate of oxygen uptake by human red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, pp. 1178-1190.

8. Huxley V.H., Kutchai H. The effect of the red cell membrane and a diffusion boundary layer on the rate of oxygen uptake by human erythrocytes. *J. Physiol*., 1981, vol. 316, pp. 75-83.

9. Yamaguchi K., Nguyen-Phu D., Scheid P., Piiper J. Kinetics of O_2 uptake and release by human erythrocytes

studied by a stopped-flow technique. *J. Appl. Physiol.*, 1985, vol. 58, pp. 1215-1224.

10. Cogan U., Shinitzky M., Weber G., Nishida T. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescent probes. *Biochemistry*, 1973, vol. 12, pp. 521-528.

11. Edidin M. Rotational and translational diffusion in membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1974, vol. 3, pp. 179-201.

12. Sinensky M. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 1974, vol. 71, pp. 522-525.

13. Herrera M., Hong N.J., Garvin J.L. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension*, 2006, vol. 48, pp. 157-164.

14. Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F., Kaldenhoff R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO_2 pore with physiological functions. *Nature*, 2003, vol. 425, pp. 734-737.

15. Saparov S.M., Liu K., Agre P., Pohl P. Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, pp. 5296-5301.

16. Agre P., Sasaki S., Chrispeels M. J. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am. J. Physiol. - Renal Physiol*., 1993, vol. 265, pp. F461-F461.

17. Ivanov I.I., Fedorov G.E., Gus'kova R.A., Ivanov K.I., Rubin A.B. Permeability of lipid membranes to dioxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 322, pp. 746-750.

18. Endeward V., Cartron J.P., Ripoche P., Gros G. RhAG protein of the Rhesus complex is a CO_2 channel in the human red cell membrane. *FASEB J.*, 2008, vol. 22, pp. 64-73.

19. Shaitan K.V., Antonov M.Yu., Tourleigh Ye.V., Levtsova O.V., Tereshkina K.B., Kirpichnikov M.P., Nikolaev I.N. Comparative study of molecular dynamics, diffusion, and permeability for ligands in biomembranes of different lipid composition. *Biochemistry (Mosc.) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.*, 2008, vol. 2, pp. 73-81.

THE EFFECT OF HYDROCARBON CHAIN LENGTH OF MEMBRANE LIPIDS, LATERAL PRESSURE AND CHOLESTEROL CONCENTRATION ON MEMBRANE OXYGEN PERMEABILITY

Gus'kova R.A., Vasil'ev N.S., Loktyushkin A.V., Ivanov I.I.
M.V. Lomonosov Moscow State University
Leninskie gori, 1, building 12, Moscow, 119234, Russia; e-mail: ivanov36@mail.ru

Abstract. We employed scanning electrochemical microscope (SECM) with inverted open platinum electrode (IOPE), integrated with Langmuir bath, to investigate the impact of long-chain hydrocarbons on the permeability of membranes for O_2. We show that oxygen permeability of membranes composed of long-chain fatty acids (C_{18} – stearic or C_{20} – arachidic) sharply decreases in response to increasing surface pressure in the range 20-45 mN/m. Addition of cholesterol to these membranes (up to 10%) inhibits the effect of surface pressure on the O_2 transfer rate. Permeability of membranes composed of lipids with shorter chains (C_{16} and less) remains high regardless of lateral pressure. Physiological role of the detected phenomena is discussed in connection with O_2 gas exchange through the membrane of erythrocytes in blood capillaries. We discuss formation of the elongated cell shape in the capillary, increase in the surface area of the cell membrane, reduction of surface tension in the membrane, reduction of the gap between the erythrocyte membrane and the walls of the capillary, movement of the cell along the capillary, the causes and speed of the cell return to its normal biconcave shape.

Key words: *Dioxygen diffusion, long-chain hydrocarbons monolayers, surface pressure, cholesterol, SECM.*

ТОНКАЯ СТРУКТУРА И ДИНАМИКА ПРОФИЛЕЙ EB3 НА МИКРОТРУБОЧКАХ В КЛЕТКАХ ФИБРОБЛАСТОВ

Костарев А.В.[1], Мустяца В.В.[1, 2], Творогова А.В.[1], Атауллаханов Ф.И.[1, 2], Гудимчук Н.Б[1, 2], Воробъев И.А[1, 3]

[1] Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
ул. Воробъевы горы , стр. 2, г. Москва, 119234, РФ
[2] Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН
ул. Косыгина, стр. 4, г. Москва, 119991, РФ
[3] Назарбаев университет
ул, Кабанбай Батыра, стр. 53, г. Астана, 010000, Казахстан; e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com
Поступила в редакцию: 04.07.2018.

Аннотация. У млекопитающих семейство плюс-конец-связывающих белков микротрубочек (EB) содержит три белка EB1 / 2/3, которые ассоциируются с растущими кончиками микротрубочек и могут регулировать их динамику, путем привлечения белков-партнеров для полимеризации тубулина. Было показано ранее, что EB-белки распознавали стабилизирующую шапочку из ГТФ / ГДФ-фосфат тубулина в растущих микротрубочках *in vitro*, служащую маркером мгновенной стабильности микротрубочки. Тонкая структура и динамика зоны связывания распознаются EB-белками в живых клетках. В этой работе на культуре фибробластов 3T3, трансфецированных EB3-RFP мы изучили профиль интенсивности EB3-комет. Было показано, что профили распределения белка EB3-RFP на микротрубочках в мышиных фибробластах хорошо описываются базовыми теоретическиеми представлениями. Однако мы обнаружили, что в некоторых случаях профиль имеет более сложную структуру, отличающуюся от классического представления. Под сложной формой мы понимаем дополнительную зону повышенной интенсивности белка EB3-RFP на микротрубочке позади основной кометы, которая проявляется на кимограммах в виде характерных стационарных полос, которые в свою очередь могут появляться как в теле микротрубочки, так и вблизи основного пика. Мы считаем, что данный факт может свидетельствовать о более сложной структуре растущего плюс-конца микротрубочки и ГТФ-шапочки в частности.
Ключевые слова: *Концевой белок, микротрубочка, ГТФ-тубулин.*

ВВЕДЕНИЕ

Клетка является сложной, многокомпонентной биологической системой, способной к гомеостазу. Микротрубочки – полимеры белка тубулина, представляющие собой полярные длинные структуры, сопоставимые по длине с размером клетки. Они обеспечивают такие функции как: внутриклеточный транспорт, формирование веретена деления, сегрегацию хромосом во время деления, а также принимают участие в миграции клеток [1]. Микротрубочки в клетках создают целую сеть, способную перестраиваться и обновляться за счет механизма переключения отдельных микротрубочек от роста (полимеризации) к укорочению (деполимеризации).

При полимеризации микротрубочки к ее концу присоединяются димеры тубулина, ассоциированные с молекулами гуанозинтрифосфата (ГТФ). Через некоторое время после встраивания молекулы ГТФ претерпевают гидролиз, ведущий к изменению конформации тубулина. Таким образом, на конце растущей микротрубочке сосредоточены ГТФ-тубулины, а тело микротрубочки преимущественно состоит из ГДФ-тубулинов. Область микротрубочки, состоящей из ГТФ-тубулинов, принято называть ГТФ-шапочкой. Считается, что стохастическая потеря шапочки, вследствие гидролиза или диссоциации ГТФ-тубулинов, приводит к быстрому переходу от роста микротрубочки к укорочению [2].

Для регулирования динамики микротрубочек в клетках существует множество специальных белков, в число которых входят так называемые концевые белки (end-binding proteins или EB). Группы концевых белков способны автономно присоединяться к растущим концам микротрубочек, модулировать их динамику и способствовать привлечению белков-партнеров, обладающих разнообразными функциями [3]. Показано, что белки семейства EB преимущественно связываются с тубулинами, ассоциированными с молекулой ГТФ [4]. Поэтому EB-белки можно использовать как маркеры растущего плюс-конца микротрубочки.

Считается, что профиль кометы EB должен иметь экспоненциальное распределение вдоль длины микротрубочки [7], однако есть основания полагать, что in vivo распределение белков EB может иметь более сложную форму [6]. В рамках данной работы мы поставили своей целью определить параметры распределения белка EB3 на микротрубочке в живой клетке и получить их зависимость от времени. Таким образом, мы оценим поведение динамического плюс-конца микротрубочки с течением времени в высоком разрешении (частота кадров 5 к / 1 сек). В качестве параметров распределения мы будем рассматривать: ширину распределения, интенсивность и скорость кометы EB3.

МЕТОДЫ

Подготовка кимограмм.

В данном исследовании использовались клетки 3T3 – мышиные фибробласты (эпителиальные клетки мыши). Клетки были трансфецированы геном, экспрессирующим белок EB3-RFP. (End-binding protein – red fluoresence protein). Записывались видео с частотой записи 5 кадров в секунду в режиме TIRF с помощью иммерсионного объектива x100/1,49 (Nikon). На видео можно было наблюдать движение белковых структур, называемых кометами EB3 (рис. 1). По мере роста микротрубочки EB3 присоединяется к ГТФ-шапочке, цикл присоединения и отсоединения занимает доли секунды. Поскольку EB3 узнает только растущий конец, на видео можно пронаблюдать эволюцию «кометы» EB3: инициацию, появление, последующее движение (фаза роста микротрубочки) и угасание, которое в первом приближении свидетельствует о прекращении роста микротрубочки и ее деполимеризации.

Первичная обработка данных проводилась в программе ImageJ. Она заключается в следующем. Первым шагом просматривается видеозапись с клеткой, и находятся кометы EB3, удовлетворяющие установленным критериям отбора. В ходе исследования были выработаны следующие критерии отбора комет: 1) кометы не должны пересекаться друг с другом, так как пересечение даст вклад в яркость конкретной области в определенное время; 2) должен четко наблюдаться момент появления кометы, что в дальнейшем будет обозначаться как рождение кометы, и момент ее угасания или смерти кометы; 3) кометы не должны уходить на периферию клетки, так как дальше они сливаются в пучки и становятся неразличимыми. На рисунке 1 указан вид приемлемых комет.

После того как все кометы были выделены и отобраны, строится максимальная проекция по времени по всему видео, таким образом, движущиеся яркие объекты (кометы EB3) оставляют след – в нашем случае трек, который можно интерпретировать как исследуемую микротрубочку от момента инициации ее роста до начала деполимеризации. Сопоставляем треки и кометы присваиваем имена и заносим в память.

Следующий шаг – построение кимограммы. Кимограмма – особый график, где по оси абсцисс длина ломаной линии, которой выделяется конкретный трек (длина и форма определяется пользователем), по оси ординат – время в кадрах (594 кадра для клеток 3T3). Благодаря кимограмме можно фиксировать конкретный момент времени в кадрах (~5 кадров соответствуют 1 секунде в реальном времени) и получать профиль интенсивности вдоль ломаной линии – трека кометы. Таким образом, мы получаем профиль распределения интенсивности свечения белка EB3 вдоль микротрубочки. Кимограммы сохраняются в виде таблиц со значениями интенсивности в каждом пикселе (по вертикали ~5 кадров соответствуют 1 секунде видео, по горизонтали – 10 пикселей ~=1 мкм). Дальнейшая обработка происходит в программе Matlab.

Получение профилей кометы.

Пользователь вручную выделяет участки «жизни кометы на кимограмме». Время жизни кометы определяется так от момента возникновения до полного исчезновения, таким образом, в область жизни кометы входят временные угасания кометы (паузы) (рис. 2а). Каждый кадр представляет собой профиль интенсивности кометы EB3 в определенный момент времени. Для каждой кимограммы есть свой набор профилей, отражающих динамику и форму распределения интенсивности белка EB3.

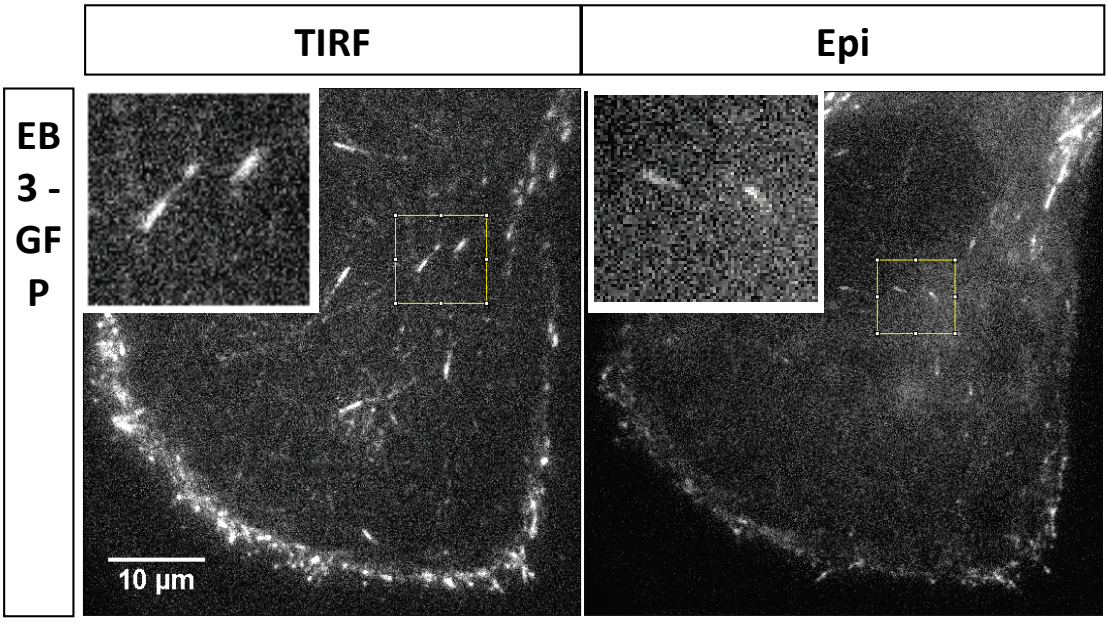


Рисунок 1. Съемка экспериментальных данных в различных режимах. Верхняя панель: клетки 3T3 (фибробласты мыши) фотографируются в двух режимах: Epi-флуоресценции и режиме TIRF. В отдельном поле показаны кометы EB3 (поле увеличено)

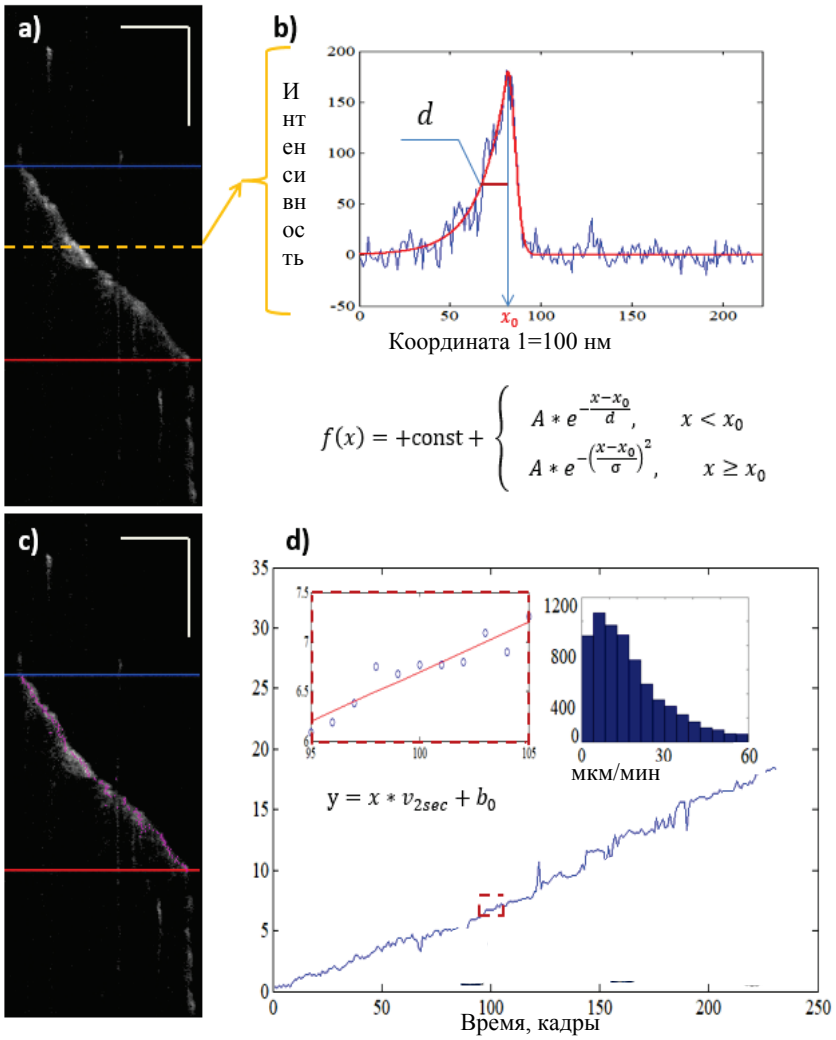


Рисунок 2. Процедура обработки кимограммы a) Кимограмма кометы EB (экспериментальные данные). Красные и синие линии показывают моменты появления и вымирания кометы EB. Желтая пунктирная линия показывает фиксированный момент «времени жизни кометы». Горизонтальная шкала составляет 6 мкм, вертикальная шкала - 20 секунд (белые линии). b) Профиль кометы EB в выбранный момент времени (20 секунд с момента возникновения). Красная линия указывает аппроксимацию профиля кусочной функцией f (x) (см. выше). c) Кимограмма кометы EB (экспериментальные данные). Фиолетовые точки указывают положение центра кометы (x0), определяемое из аппроксимации профилей кусочной функцией. d) Зависимость изменения положения центра кометы во времени. В красном пунктирном треугольнике показан фрагмент графика с точкой, в которой определяется скорость кометы в данный момент времени (20 секунд или 100 кадров). Гистограмма полученных скоростей показана около 73 килограмм

Функция профиля кометы.

Для получения характеристик кометы (длины кометы, скорости, яркости и т.д.) использовался определенный формализм, основанный на следующих положениях: 1) профиль кометы EB3 стандартно описывается экспоненциальным профилем. [7] 2) кончик микротрубочки может заостряться 3) PSF (Функция Размытия Точки) – для наших данных оставим только диск Эйри, интенсивность которого можно описать функцией Гаусса. Таким образом, мы составили кусочную функцию, чтобы следить не только за длиной кометы, но и за ее передним фронтом, который в первом приближении может отвечать за кончиком микротрубочки (рис. 2b),

$$f(x) = +\text{const} + \begin{cases} A * e^{-\frac{x-x_0}{d}}, & x < x_0 \\ A * e^{-\left(\frac{x-x_0}{\sigma}\right)^2}, & x \geq x_0 \end{cases}$$

где A – амплитуда; d – параметр экспоненты => длина кометы; σ – стандартное отклонение гауссовской функции; x_0 – положение центра кометы, const – некая константа, подстраивающаяся под общий шум. Теперь аппроксимируем все профили с помощью данной функции, оставив свободными коэффициенты (и обозначив границы подбора) A (0 800), d (0 50), x_0 (0 250), σ (0 50), const (-50 50). Диапазон для подбора был оставлен

достаточно широкий, однако для уточнения работы программы были использованы стартовые точки, о чем будет идти речь далее.

Аппроксимация профиля EB3.

Перед аппроксимацией мы подготавливаем сам профиль для корректной работы программы. Прежде всего, необходимо вычесть шум профиля. Для этого мы находим самую правую точку профиля (так как движение кометы всегда идет слева направо), удовлетворяющую данному условию: {max(profile)-min(profile)}*0.7 = a_0. Далее, если $a_0 + 5$ находится ближе, чем на 5 точек до конца профиля, то в качестве шума берется медиана первых 5 точек профиля, если это условие нарушается, то берется медиана всех точек от $a_0 + 5$ до конца профиля. Таким образом, шум считается по последним точкам профиля, если комета только родилась, и по первым, если комета уже в конце жизни, так мы точно знаем, что интенсивность кометы не влияет на шум. После вычитания шума профиль готов к аппроксимации.

Чтобы справится с негауссовским шумом (грязь, образующая стационарные точки, временный вход в область съемки других микротрубочек, образующих дополнительное свечение и т.д.) используется двойная аппроксимация профилей. Для начала все профили аппроксимируются без стартовой точки (она выбирается случайно самой программой Матлаб), далее берутся все рассчитанные x_0 и подвергаются сглаживанию функцией rloess (рис. 2c). Сглаженные положения центров попадают в стартовую точку для следующей аппроксимации.

Таким образом, программа-обработчик точнее может определить положение центра кометы и другие параметры. Это нужно для того, чтобы функция игнорировала «посторонние» участки интенсивности на профиле, а выдавала исключительно параметры интенсивности самой кометы.

Получение мгновенной скорости.

При работе с кимограммами было замечено, что комета не движется с постоянной скоростью, а движется с флуктуациями скорости, что в целом дает некую среднюю скорость, которая может не отражать поведение кометы в отдельные временные промежутки. Так для каждого профиля считается своя «двухсекундная» скорость. Строится график зависимости координаты центра кометы от времени. Для всех центров профилей кроме первых и последних пяти выбираются участки на графике длиной 11 кадров или ~2 секунд (11 точек), где 6-я точка – исследуемая. Далее 11 значений аппроксимируются прямой, где коэффициент наклона и будет двухсекундной скоростью данного профиля (рис. 2d). После этого окно смещается на один кадр и аналогичным образом определяется скорость следующего профиля. В результате, для каждого профиля есть свой набор параметров: A – Амплитуда, d – длина кометы, σ – длина переднего фронта кометы или длина кончика микротрубочки, v_{2sec} – скорость кометы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты основаны на статистике, полученной по 73 кимограммам, взятых с фибробластов, отснятых в TIRF режиме. Для начального момента времени был выбран момент возникновения кометы (см. методы). Выравнивание проводилось по всем начальным профилям всех данных. Через каждую секунду (~= 5 кадров) выбирались профили для всех комет, времена жизни которых были больше, чем время конкретного среза. Каждый профиль аппроксимировался описанной выше кусочной функцией и для каждого были получен набор из четырех параметров (амплитуда – интенсивность, сигма, длина кометы, двухсекундная скорость). Для времен больше 30 секунд остается слишком мало профилей с параметрами для усреднения, поэтому отсечка проводилась до тех пор, пока в усреднение входило больше двадцати профилей. На рисунке 3 представлены графики изменения среднего и медианного параметров. Оказалось, что параметры кусочной функции, описывающие длину и сигму кометы EB3-RFP имеют схожую кинетику, характерное время выхода на стационар 3,5 сек. Двухсекундная скорость в среднем также изменяется не сильно и остается относительно постоянной). Средняя и медианная интенсивность также не сильно изменяется, небольшое уменьшение может быть связано с эффектом фотовыгорания. Таким образом, это может свидетельствовать о том, что в среднем на протяжении периода полимеризации микротрубочки структура GTP-шапочки остается неизменной.

Существенная часть профилей не описывается классическим представлениям о распределении белка EB3 на микротрубочке.

Удивительно, но, несмотря на то, что в целом наша функция хорошо подходит для описания среднего профиля интенсивности EB3-RFP отдельные EB3-профили (9 % от общего числа R2<0,6 и A>90) имеют дополнительные пики интенсивности EB3-RFP. Такие отклонения могут представлять собой либо дополнительные сложности в связывании EB3 с микротрубочками, либо могут быть вызваны шумом измерения, который, как ожидается, будет более выраженным для тусклых комет с плохим отношением сигнал-шум. Чтобы прояснить этот момент, мы построили зависимость коэффициента детерминации (R2) для каждого профиля как функцию амплитуды EB3-кометы. Учитывая четкую корреляцию между плохим коэффициентом детерминации и низкой интенсивностью кометы, мы исключили профили с амплитудами ниже 90 у.е. от рассмотрения. Однако даже среди профилей EB3, чья амплитуда была выше 90 у.е., существенные отклонения от функции модели представляли собой ярко выраженную область (показаны на рисунке 4, красная область).

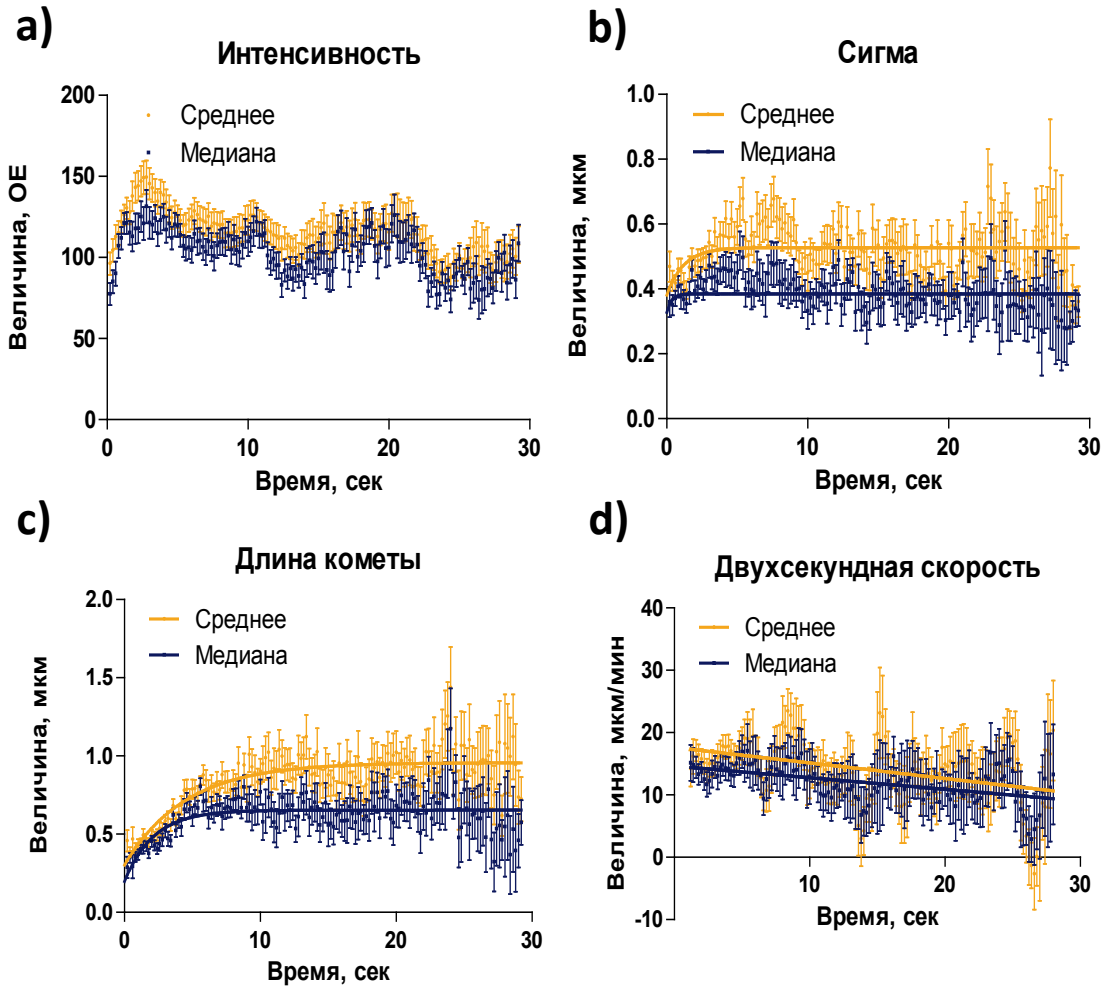


Рисунок 3. Средние параметры кометы EB3 остаются постоянными с течением времени a) Интенсивность (пик) кометы, незначительное уменьшение интенсивности связано с эффектом фотовыгорания. b, c) Сигма и длина кометы выходят на стационар после 3,5 секунд с момента рождения кометы. d) Двухсекундная скорость остается относительно постоянной в районе 15 мкм/мин, что соответствует средним скоростям комет *in vivo*

Оказалось, что кимограммы, обогащенные профилями из красной зоны имели стационарные полоски (показаны желтыми стрелками на рис. 4). Сами профили, попадающие в красную зону, на кимограммах обозначены желтыми линиями с левого края кимограммы.

ОБСУЖДЕНИЕ

По всей видимости, дополнительные зоны связывания EB3 могут свидетельствовать о появлении в теле микротрубочки дополнительных сайтов, содержащих ГТФ-тубулин, встроенный в тело микротрубочки. Причиной появления таких зон могут быть негидролизованные ГТФ в кармане субъединицы тубулина. Так, сайт связывания EB3 остается на месте, но микротрубочка продолжает полимеризацию и комета продолжает движение. Поэтому на кимограмме помимо основного пика появляется стационарная зона, представляющая собой полоску, которая со временем исчезает. В дальнейшем планируется дать количественные оценки этой дополнительной зоны связывания. Однако есть ряд трудностей с описанием дополнительных зон: такие зоны имеют разную интенсивность и могут смешиваться или тонуть в общем шуме, что делает их автоматическое распознавание затруднительным. Так же в дальнейшем планируется проверить существующие модели. Предварительная оценка показывает, что получить такие дополнительные зоны связывания, используя классические представления о полимеризации микротрубочки, невозможно. Это и будут задачи следующего исследования.

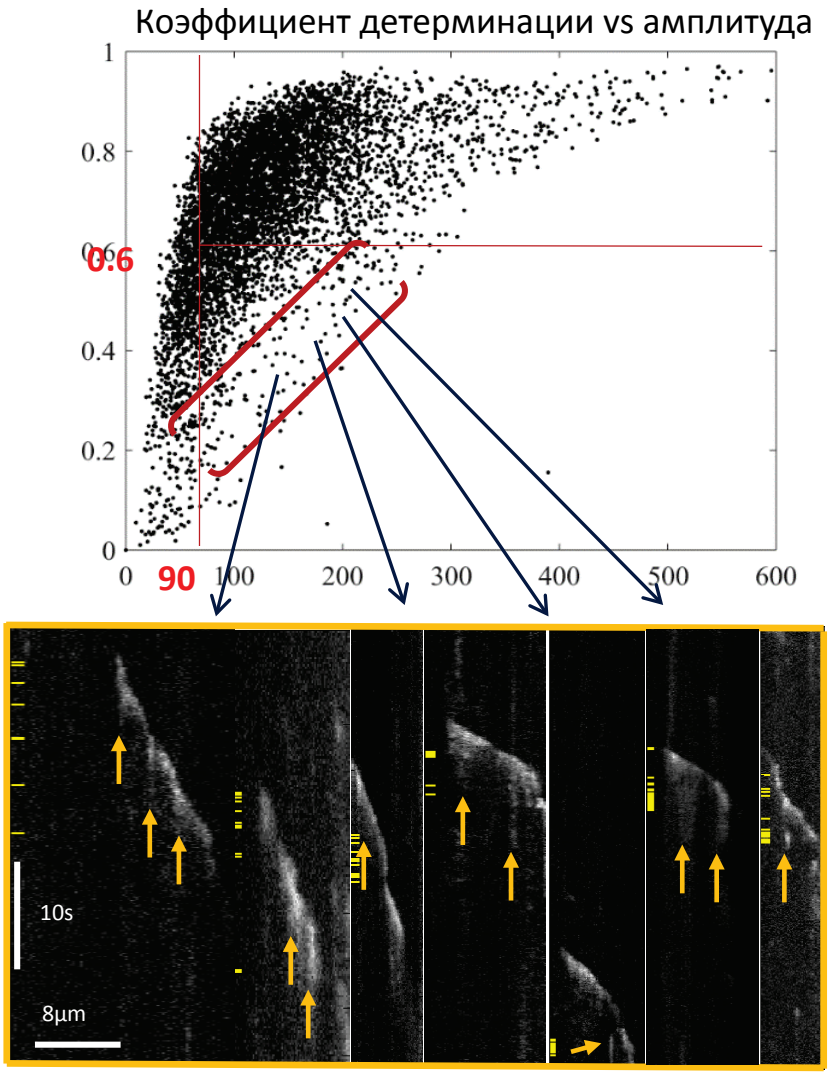


Рисунок 4. Отдельные профили белка EB3-RFP имеют дополнительную область интенсивности, которые могут являться EB3-островками a) зависимость коэффициента детерминации от амплитуды, ниже показаны кимограммы, для которых характерно появление дополнительной области связывания b) Модифицированная модель VanBuren et al. с добавленным присоединением EB3

Работа была поддержана грантами РФФИ № 16-34-60113, 17-54-33009 и 18-34-00944.

Список литературы / References:

1. Bruce A., Bray D., Hopkin K. Essential Cell Biology third edition. *Garlard science*, 2013, vol. 731, p. 577.

2. Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1997, vol. 13, pp. 83-117.

3. Mustyatsa V.V., Boyakhchyan A.V., Ataullakhanov F.I., Gudimchuk N.B. Proteins of the EB family: functions and mechanisms of interaction with microtubules. *Biochemistry*, 2017, vol. 82, iss. 7, pp. 1033-1046.

4. Bieling P. [et al.] Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature*, 2007, vol. 450, pp. 1102-1104.

5. Duelberg C., Thomas S. [et al.] The size of the EB cap determines instantaneous microtubule stability. *eLIFE Research article*.

6. Satoko N., Grigoriev I., Nogi T. DissectingEB1 and ch-TOG at Microtubule Ends. *PLOS ONE*, 2012, vol. 7 (12), pp. 1-18p.

7. Dominique S., Castele B.T., McIntyre A.J., Odde D.J. Estimating the microtubule GTP Cab Size *in vivo*. *Curr. Biol.*, 2012, vol. 22 (18), pp. 1681-1687.

FINE STRUCTURE AND DYNAMICS OF EB3 PROFILES ON MICROTUBULES IN FIBROBLAST CELLS

Kostarev A.V.[1], Mustyatsa V.V.[1, 2], Tvorogova A.V.[1], Ataullakhanov F.I.[1, 2], Gudimchuk N.B.[1, 2], Vorobiev I.A.[1, 3]

[1] Moscow State University

Vorobyevy gory St., 2, Moscow, 119234, Russia

[2] Center for Theoretical Problems in Physico-Chemical Pharmacology Russian Academy of Sciences

Kosygina, St., 4, Moscow, 119991, Russia

[3] Nazarbayev University,

Kabanbay batyr Ave., 53, Astana, 010000, Republic of Kazakhstan; e-mail: aleksandrkostarevv@gmail.com

Abstract. In mammals end-binding (EB) proteins family contain three members, EB1/2/3, which associate with the growing tips of microtubules and modulate their dynamics directly and indirectly, by recruiting essential factors to fine-tune microtubules for their many essential roles in cells. Previously EB proteins have been shown to recognize a stabilizing GTP/GDP-pi cap at the growing microtubules in vitro, serving as a marker of instantaneous microtubule stability. However, the fine structure and dynamics of the zone recognized by EB-proteins in live cells have not yet been examined in detail. It has been shown that, on average, EB3-RFP protein profiles on microtubules in murine fibroblasts remain unchanged. However, we found that in some cases the profile has a more complex structure, which differs from the classical representation. By complex form we mean the additional EB3-RFP protein intensity zone on the microtubule, which manifests itself on kymographs as characteristic stationary bands, which in turn can appear both in the microtubule body and near the main peak. We believe that this fact may indicate a more complex structure of the growing plus-end microtubules and GTP caps in particular.

Key words: *End-binding protein, microtubule, GTP-tubulin.*

О ЧЕМ ГОВОРЯТ ИЗОТОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТЯЖЕЛОЙ ВОДЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Лобышев В.И.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы 1/2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: lobyshev@yandex.ru

Поступила в редакцию: 05.07.2018.

Аннотация. Дан обзор работ по изотопным эффектам, связанным с заменой обычной воды на тяжелую. Отмечены наиболее общие признаки биологических изотопных эффектов – адаптация, ингибирование биохимических и физиологических реакций, увеличенная стабильность к высокой температуре и другим внешним экстремальным условиям, замедление биологических часов, быстрота появления эффектов. Особое внимание уделено неожиданным эффектам малых концентраций дейтерия в воде и в воде с пониженным содержанием дейтерия.

Ключевые слова: *D_2O, вода с пониженным содержанием дейтерия, живые организмы, клетки, биополимеры.*

Изотопные эффекты D_2O на живых объектах начали изучать сразу после открытия дейтерия и разработки метода обогащения воды изотопом дейтерия. В первой же работе было показано, что семена табака не прорастают в D_2O [1]. В течение двух лет было проведено множество экспериментов на разных организмах, включающих одноклеточные водоросли, низшие грибы, планарии, аквариумные рыбы. Был сделан вывод о том, что тяжелая вода с концентрацией дейтерия, большей 70 % несовместима с жизнью даже для таких простых автотрофных организмов, как низшие водоросли, требующие для развития лишь воду, углекислый газ, минеральные соли и свет [2, 3]. Высказанная точка зрения лишь подтверждалась последующими работами, проводимыми на более широком наборе живых организмов. В это же время развивается химия изотопов. Однако, в то время как для большинства химических реакций с участием протона изотопный эффект проявляется в уменьшении скоростей реакции примерно в 1,5 раза, замена обычной воды на тяжелую приводит к полному торможению большинства биологических функций. В связи с этим, интерес к изучению изотопных эффектов быстро возрастал, но, по политическим причинам, к 1938 г. публикации на тему тяжелой воды прекратились и возобновились лишь к середине 50-х годов. Сформулированная выше точка зрения о невозможности жизни в D_2O была опровергнута лишь в 1959 г., когда удалось получить культуры одноклеточных водорослей, жизнеспособных в 99,7 %-ной тяжелой воде. Оказалось, что при переносе водорослей из обычной воды в высоко концентрированную тяжелую воду требуется неожиданно длительный период адаптации, после которого клетки начинают вновь расти и делиться [4]. Наряду с прямой, существует также обратная адаптация при переносе культур обратно в среду с обычной водой. Это открытие не получило убедительного объяснения по настоящее время. Считается, что «функциональная адаптация имеет в своей основе смену биосинтезов на базе регуляции генной активности всех клеток или клеток регуляторных структур» [5].

Изотопные эффекты нельзя объяснить с позиций классической физики. Детальная интерпретация механизмов изотопных эффектов дейтерия весьма сложна. Наиболее существенной причиной первичных изотопных эффектов является различие в нулевых энергиях колебаний связей с атомом водорода, а сам факт существования изотопных эффектов является непосредственным следствием принципов квантовой механики. Поскольку изотопные эффекты дают непосредственную информацию об энергиях связей, этот метод успешно применяется для анализа механизмов катализа в химии и энзимологии [6]. Аналогично объясняются и изотопные эффекты в равновесии реакций с участием протона. Наряду с первичными, наблюдаются также вторичные изотопные эффекты аллостерического типа. Большое значение имеют изотопные эффекты воды как растворителя, опосредованные через изменения свойств воды при замене протия на дейтерий. Эволюцию взглядов и анализ физико-химических механизмов изотопных эффектов D_2O можно найти в монографии [7].

Ингибирующие эффекты в росте культур микроорганизмов проявляются очень быстро. Примечательно, что развитие бактерий *Deinococcus radiodurans* полностью прекращается в D_2O, хотя они выдерживают дозу ионизирующего излучения до 10000 Гр (для человека предел 5 Гр) [8]. Млекопитающие выдерживают дейтерирование лишь до 30 % дейтерия в тканевой жидкости, однако дейтерированные живые организмы и культуры тканей выдерживают более высокие температуры, давление и лучевую нагрузку. Остановка деления клеток в D_2O приводит к естественному желанию использовать D_2O для лечения опухолей. Такие работы были с успехом выполнены на лабораторных животных, но не вошли в клиническую практику [7]. Наши недавние работы показали, что даже 10%-ная тяжелая вода, принимаемая мышами для питья, увеличивает на 4 дня медианное значение продолжительности жизни мышей с инокулированной карциномой молочной жедезы 4T1 [9]. При этом, важно отметить, что эффекты D_2O являются обратимыми в отличие от токсичных фармакологических препаратов. Совместное использование растворов D_2O и химио- или радиотерапии позволяет значительно сократить лучевую и/или химическую нагрузку на организм пациентов. D_2O является уникальным

агентом, не только сдвигающим фазу, но и увеличивающим период биологических часов, что может быть использовано для изучения феномена биологических часов.

Тяжелая вода стабилизирует искусственные липидные мембраны, делает их более жесткими изменяя таким образом гидрофобно-гидрофильное равновесие между мембраной и окружающей средой [10]. Универсальным ответом на смену воды в растворах биополимеров является повышение температуры денатурации, а также увеличение энтальпии плавления что обусловлено, в основном, влиянием D_2O как растворителя. Зная изотопный эффект в энтальпии плавления льда можно провести оценку количества «плавящейся» связанной воды, теряющей одну степень свободы при денатурации белка. Используя гармоническое приближение можно оценить вклад, вносимый связанной водой в нативное состояние биополимера. Показано, что процесс плавления фибриллярного коллагена в значительной степени определяется изменением свойств связанной воды, в то время как этот вклад составляет небольшую часть от полной теплоты плавления глобулярной РНК-азы [7]. Еще большую информацию о роли связанной воды в стабилизации биополимеров можно получить из экспериментов в воде с переменным изотопным составом от 0 до 100 % дейтерию. Нами были предложены модели, включающие характер связывания дейтерия с белком и температуру денатурации и объясняющие нелинейные зависимости температуры денатурации биополимера от содержания дейтерия в воде [7, 11]. Эта модель может быть использована также для других активационных процессов в среде с переменным бинарным составом для решения вопросов предпочтительной сольватации. Сходство профилей зависимостей температуры денатурации миозина и его фрагментов, и кинетического изотопного эффекта в гидролизе АТФ от концентрации дейтерия в воде указывает на тесную связь термодинамики и кинетики на микроуровне [12], что является подтверждением концепции Гурвича А.Г., высказанной еще в 1930 г. [13]. Исследование кинетических изотопных эффектов в воде с разной концентрацией дейтерия в англоязычной литературе носят название “proton inventory method” и дают возможность определить количество протонов, участвующих в химических реакциях с переносом протона. Используя этот метод, мы показали, что стадия спада М412 фотоцикла бактериородопсина сопровождается переносом двух протонов, а стадия спада О640 только одного протона [14].

Как видно из приведенных примеров, изучение изотопных эффектов D_2O и растворов с переменным содержанием дейтерия дают богатую информацию на разных уровнях организации биологических систем. Экстраполяция известных изотопных эффектов тяжелой воды к природным значениям концентрации дейтерия не позволяет ожидать значимых биологических эффектов при небольших отклонениях концентрации дейтерия от ее природного содержания. Здесь уместно напомнить, что природная вода является смесью изотопных форм молекул вследствие наличия стабильных изотопов ^{16}O, ^{17}O, ^{18}O, ^{1}H, ^{2}H. Относительное содержание наиболее распространенных изотопов дейтерия и ^{18}O в природных водах составляет в среднем 0,015 % (150 ppm) и 0,2 % и варьирует в пределах 0,0079-0,0195 % и 0,1887-0,2083 % соответственно, вследствие фракционирования изотопов воды при фазовых переходах пар-жидкость-лед (снег), при сорбции и фильтрации в природных процессах [15]. Тем не менее, такие работы были выполнены еще в 30-е годы, но они долгое время не возобновлялись и не цитировались. Поэтому их хочется описать наиболее подробно. Экспериментально было показано, что небольшие изменения естественного изотопного состава воды, могут приводить к неожиданно большим эффектам, часто противоположным действию концентрированной тяжелой воды.

Эксперименты с водой, слегка обогащенной дейтерием, были выполнены в 1933-1935 гг. [16-38]. Исследовано действие воды с содержанием дейтерия 0,06 % на развитие водоросли *Spirogyra nitida*, культивируемой под рассеянным светом при температуре 10-14 ^{0}C. Для филаментов водоросли в воде с повышенным содержанием дейтерия (в дальнейшем для краткости будем использовать термин «утяжеленная» вода) было характерно уменьшение подвижности, значительное уменьшение количества разрывов и увеличение длительности жизни [17]. В контрольном опыте в дистиллированной воде филаменты рвались на более мелкие фрагменты, а их распределение по длинам было более широким. В одном из опытов филаменты в «утяжеленной» воде вовсе не имели разрывов в течение полутора месяцев [18, 19]. Разрывы наблюдали лишь в длинных филаментах, но не в коротких – использованных для дальнейших количественных исследований. В обычной воде у 322 клеток, содержащихся в 15 коротких филаментов из 5-50 клеток, средняя продолжительность жизни одной клетки составила 3 дня, в то время как в «утяжеленной» воде у 355 клеток, содержащихся в 16 филаментах, средняя продолжительность жизни клеток составляла 6 дней. Увеличенная продолжительность жизни в «утяжеленной» воде наблюдалась во всех случаях, независимо от средней длины клетки. В то же время, увеличение концентрации дейтерия в воде не приводило к заметным изменениям в скорости деления клеток или их удлинения, однако вследствие большей долговечности клеток наблюдалось большее число делений клеток [22]. Особо хочется подчеркнуть, что многократная (до 6 раз) перегонка воды не изменила получаемых результатов. Это дает основание утверждать, что наблюдаемые эффекты не обусловлены наличием посторонних примесей в «утяжеленной» воде, появившихся в процессе электролиза.

В работе [21] было установлено, что «утяжеленная» вода с малой концентрацией дейтерия оказывает влияние на продолжительность жизни *Spyrogira* только в фотосинтезирующих водорослях на свету, но не в темноте. Из 1088 клеток водоросли в 0,47 % D_2O через два дня при освещенности примерно 646 лк развивается

72 % клеток, тогда как только 18 % из 1129 клеток оставались живыми в темноте. В обычной воде 32 % из 1266 развивались на свету той же интенсивности и 16 % из 789 клеток в темноте. На основании этого эксперимента авторы делают вывод о том, что «утяжеленная» вода способствует процессу фотосинтеза. В экспериментах с морскими диатомовыми водорослями *Nitzchia bilobata* в морской воде, содержащей 1 % дейтерия, было обнаружено 16-ти процентное увеличение лаг-периода на кривых роста. Для другой водоросли *N. closterium* отмечается противоположная тенденция, однако, этот результат статистически не достоверен. Изменений стационарной концентрации диатомовых в воде с различным изотопным составом не обнаружено [29]. Наряду с ингибирующим (или стабилизирующим) влиянием «утяжеленной» воды было обнаружено также стимулирующее действие на живые организмы. Так количество клеток *Euglena gracilus*, культивируемых в течение 45 суток при температуре 17-20 ^{0}C, было увеличено на 15,6 % в среде, содержащей 0,06 % дейтерия. При этом количество подвижных микроорганизмов по сравнению с контролем возрастало примерно в 2,3 раза [19].

Аномальное влияние «утяжеленной» воды было подтверждено в опытах с низшими грибами [24, 25]. Исследуя *Saccharomyces cerevisae* в среде Вильямса в электролизной воде с содержанием 0,06 % дейтерия за 143 часа опыта, он не обнаружил различий между контролем и опытом в числе клеток на единицу объема, в количестве почек, числе мертвых или поврежденных клеток, проницаемых для метиленового синего. В то же время в «утяжеленной» воде общий объем клеток после центрифугирования в мерных пробирках был на 20 % больше, чем в контроле, хотя средний размер клеток в опыте лишь на 3% больше. Клетки в «утяжеленной» воде были более однородны по размеру – коэффициент вариации формы на 8% меньше, чем в контроле. Сухой вес дрожжей оказался больше на 26 %, что свидетельствует о большем количестве синтезированного твердого вещества в клетках, выросших в среде с повышенным содержанием дейтерия. В работе [25], наряду с вышеуказанными результатами, отмечается, что дрожжи, выращенные в «утяжеленной» воде, содержат больше гликогена, но меньше азота. Наибольшее влияние малых добавок дейтерия в среде наблюдали во время быстрой клеточной пролиферации, когда соотношение средней поверхности клеток к их объему максимально.

Еще более поразительные результаты были получены Майером [26, 27]. После выращивания в течение 5 дней чистой культуры *Aspergillus sp.* в инкубаторе при температуре 37 ^{0}C в среде Пфеффера сухой вес мицелия, выросшего в среде, содержащей 0,47 % дейтерия, оказался в 16 раз больше, чем в контроле. Отмечены также морфологические изменения культур, выросших в средах с различным изотопным составом. В обычных условиях плесень имеет плоскую форму и равномерно распределенные плодовые тела. В «утяжеленной» воде плесень сильно завита, имеет провалы и напоминает рельеф коры головного мозга, плодовых тел существенно меньше, а их распределение по поверхности очень неравномерно. Исследование выделения газа при росте пекарских дрожжей в растворе Пастера, содержащем 0,25 и 0,5 % D_2O, не дали столь больших эффектов. В конце ферментации количество газа в 0,5 % D_2O было уменьшено на 6-6,5 % [31].

Не было найдено изменений в регенерации плоских червей *Phagocata gracilis* в 0,06 %-ной тяжелой воде [22]. Однако, через несколько месяцев можно было наблюдать качественное различие. В обычной воде планарии сморщились примерно до 1/5 от исходной длины тела, тогда как в «утяжеленной» воде сокращение было незначительным. Опыты с планариями были повторены с большей концентрацией дейтерия – 0,47 % и был обнаружен новый эффект. На планариях в этой воде быстро паразитировал плесневый грибок, и животные погибли в течение трех недель [32]. В некоторых опытах живые животные покрывались слизью, либо пучками мицелия. В этой же работе аналогичное ускорение роста плесневых грибов обнаружено в экспериментах с прорастающими семенами *Aquilegia.* На семенах, замоченных «утяжеленной» водой появилась большая масса мицелия белого цвета. Этот гриб в основном сапрофитен, т.к. появился, в основном, на не проросших семенах. Судя по приведенным фотографиям, контрольные животные и семена были свободны от паразитов. Результаты этой работы хорошо согласуются с данными Майера об активации роста плесени в «утяжеленной» воде.

Пытаясь понять механизм действия малых концентраций дейтерия на живые организмы, Банес провел ряд экспериментов на молекулярном уровне [23]. Ему удалось обнаружить замедление гидролиза крахмала панкреатической амилазой и ингибирование зимазного комплекса в воде, содержащей 0,06 % дейтерия. После 24-часовой инкубации амилазы в «утяжеленной» воде стадия эритродекстрина достигалась за 8 минут, а в контроле за 6 минут. Преинкубация зимазного комплекса в «утяжеленной» воде приводила к 10 %-ному уменьшению количества CO_2, причем этот эффект не менялся при увеличении времени преинкубации фермента от 16 до 166 часов. Отмечалось также, что влияние дейтерия не проявляется при проведении реакции без преинкубации фермента или при инкубации одного лишь субстрата. Банес считал, что обнаруженные изменения ферментативной активности могут быть возможной причиной влияния малых концентраций дейтерия на живые организмы. Описывая работы Банеса, следует сказать также о том, что он с 1932 г. активно исследовал влияние талой и конденсированной воды из пара на живые организмы. Основной причиной, объясняющей различное биологическое действие этих вод, он считал сохранение структурированности в талой воде и ее полное разрушение в конденсированной воде.

Влияние 0,11 % тяжелой воды испытано на мышах, зараженных саркомой [30]. Из 100 мышей с инокулированной опухолью 50 штук в течение 10 дней получали инъекции по 1 см^3 «утяжеленной» воды

ежедневно внутрь опухоли и вокруг нее. Контрольная группа мышей получала инъекции обычной воды. В большинстве случаев различий в развитии опухолей не обнаружено, однако, в 12 % случаев наблюдали ускоренный рост и увеличение размеров опухоли в опытной серии. Авторы работы полагали, что этот факт нельзя объяснить случайными причинами и связывали его с активирующим влиянием «утяжеленной» воды.

Наряду с перечисленными, существуют такие работы, в которых влияние малых добавок тяжелой воды не обнаружено. Так, в воде с концентрацией дейтерия 0,05 % наблюдали лишь небольшое замедление прорастания семян и роста проростков люпина [17]. Не обнаружено также отличий от контроля в ряде биологических процессов, а именно: в ферментации пекарских дрожжей; в реакции мышей на инъекции физиологического раствора; в поведении золотой рыбки; в ритмических сокращениях гладкой мускулатуры полоски кишечника кошки; в индуцированных различными фармакологическими препаратами сокращениях образцов гладких мышц из кишечника кошки, стенок сосудов белых крыс, стенок матки морской свинки; в давлении крови и дыхании наркотизированных кошек при внутривенных инъекциях физиологического раствора, а также при действии тинктуры наперстянки. К сожалению, сравнить эти результаты с данными других авторов невозможно, поскольку в этой работе полностью отсутствует описание постановки эксперимента.

Добавленная D_2O в количестве $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ % не изменила характеристик роста популяции водяных блох [33]. Не наблюдалась стимуляции прорастания семян гороха *Pisum sativum* [34]. В 0,46-процентной тяжелой воде не было замечено количественных или качественных различий в следующих процессах: прорастании милдью пшеницы *Erysiphe graminis tritici*, скорости роста корешков проростков пшеницы, скорости дыхания проростков пшеницы, а также, в противоположность Майеру, в росте плесени *Aspergillus niger* [35]. «Утяжеленная» вода в концентрации 0,13; 0,7 и 5 % не изменила морфологии и скорости размножения молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* и *L. Bulgaricus* [36]. Незначимый результат получен также в [37] при исследовании влияния 1-процентной тяжелой воды на активность каталазы и амилазы мышц и скорость гидролиза глюкозида амигдалина эмульсией из горького миндаля. Изменений в ферментативной активности не было обнаружено как сразу после добавления тяжелой воды, так и при предварительной инкубации фермента и субстрата в растворе «утяжеленной» воды в течение нескольких часов.

Чаще всего авторы работ, получивших незначимые результаты, видят причину появления эффектов малых концентраций дейтерия в других работах за счет посторонних примесей. Это мнение, хотя и может иметь отношение к некоторым работам, следует признать ошибочным. Достаточно вспомнить уже цитированную работу [17], где было показано, что многократная перегонка тяжелой воды не привела к изменению результатов. Кроме того, в ответ на замечания оппонентов, в специально выполненных работах было показано, что стимуляция роста плесени, растущей в воде, обогащенной дейтерием, не может быть обусловлена, например, примесями парафина [20, 26].

Наиболее тщательно, на наш взгляд, выполнена работа [38], в которой содержится также анализ способа приготовления воды. Показано, что для исключения дополнительных ошибок и обеспечения одинакового pH необходимо дистиллировать обычную и «утяжеленную» воду и стерилизовать растворы в одном, желательно стеклянном приборе. В противном случае растворы имеют различающиеся значения pH, что приводит к существенным изменениям результата в контрольных экспериментах. Были исследованы водоросли – *Lemna minor, Chlamidomonas, Phormidium autumnale;* безхлорофилльные организмы: грибы – *Rhizopus nigricans, Penicillium eitrinum;* бактерии – *B. cloacae, B.subtilis, Sarcina lutea;* дрожжи – *B. cerevisiae.* Показано, что в воде, содержащей 0,1 % дейтерия, значительно активируется развитие водорослей (у *Lemna* активация выражена слабо), сильно угнетается рост как скороспелых, так и не скороспелых бактерий, несколько ускоряется рост дрожжей. Вода, содержащая 0,13 % дейтерия, значительно замедляет развитие проростков овса, но их реакция на освещение такая же, как в контроле. В этой же работе было проверено влияние разбавленной тяжелой воды на подвижность микроскопических водяных змей *Ancylus tasmanicus* длиной 2-3 мм. В воде, содержащей 0,13 % дейтерия, подвижность змей уменьшалась через 2-3 дня и через 3 недели движения практически полностью прекращались. Этот феномен оказался обратимым. После смены «утяжеленной» воды на обычную, через 3 дня змеи ползали и активно питались.

На этом литературные источники 30-х годов, описывающие влияние малых добавок тяжелой воды на живые организмы, исчерпываются. После длительного перерыва аналогичные работы были возобновлены в 60-х годах. В работах Б.Н. Родимова с сотр. [39-41] было показано активирующее влияние талой воды, полученной из снега, на ряд биологических процессов и было получено увеличение продуктивности сельскохозяйственных животных и растений. В эксперименте с двумя группами по 14 кур несушек, пивших обычную и снеговую воду, было получено, что за время с декабря по март среднее количество яиц на одну несушку и общий вес яиц в опытной группе в 2 раза больше, чем в контрольной. Отмечается, что, хотя подопытные куры пили талой воды больше, корма они потребляли столько же, сколько контрольные. За это же время суммарный привес поросят в опытной группе оказался в 1,4 раза больше, чем в контрольной. Сила роста семян пшеницы, замоченных талой водой была на 41 % больше, чем в контроле. Огурцы, которые поливали талой водой после высадки рассады дали урожай 210 %, а те, у которых замачивали еще и семена – 290 %, урожай редиса составил 230 % [39].

К этому времени уже существовала хорошо разработанная теория фракционирования изотопов при фазовых переходах воды. Наиболее «облегченной» является вода из свежевыпавшего снега. Поэтому рабочей гипотезой, объясняющей влияние талой воды на животных и растения, стало стимулирующее влияние пониженной концентрации дейтерия в воде. Однако, оставалась еще альтернативная гипотеза об особых свойствах "структурированной" талой воды, существующая еще с 30-х годов. Последующий эксперимент позволил устранить эту альтернативу. Три группы семян ячменя замачивали около 8 часов в разных водах – талой снеговой, талой с добавлением недостающего количества тяжелой воды (0,003 %) и контрольной водопроводной [40]. Затем семена подсушивали и высевали. Второй и третий варианты опыта дали сходные результаты. В первом опыте со снеговой водой вес зерна оказался на 18 %, а биологическая урожайность на 25 % больше. Аналогичный полевой эксперимент с пшеницей дал еще более убедительное подтверждение (22 и 56 % соответственно) гипотезы о стимулирующем влиянии воды с пониженной концентрацией дейтерия. Эти эксперименты показали также, что возможное объяснение наблюдаемых эффектов за счет не идентифицированных высокоактивных примесей несостоятельно, поскольку стимулирующий эффект снимался добавлением небольшого количества тяжелой воды.

В работе [41] представлены результаты исследований разнообразных биологических объектов, где было показано, что снеговая вода задерживает старение культур Хела, Хеп-2, детройт-6, 580, печени и фибробластов куриных эмбрионов. Даже через 7-8 суток не было замечено деградации и еще наблюдали рост культур. Был проведен также опыт с повышенным до 3 % содержанием дейтерия в питьевой воде мышей. Контролем в этом случае была обычная вода. Вес новорожденных мышат в этом опыте был на 20 % меньше, а среди мышат преобладали самцы (около 75 %). Мышата росли медленнее, половое развитие у них запаздывало. Самки второго поколения оказались неспособными к лактации и их мышата погибали. Третьего поколения получить не удалось. Было показано также, что дейтерий аккумулируется в яичниках белых мышей, что приводит к морфологическим изменениям на всех стадиях развития яйцеклеток. Использование талой воды в качестве питьевой привело к качественно противоположным результатам, а развитие яйцеклеток стимулируется водой с пониженной концентрацией дейтерия.

Качественно похожие результаты были получены в опытах с мухами дрозофилами. В контрольной среде, содержавшей водопроводную воду, соотношение количества самцов и самок было равно 48:52. В среде, содержащей снеговую воду и воду с искусственно пониженной концентрацией дейтерия количество самок увеличилось в первом поколении 41,4:58,6 и в третье поколении возросло до 39,6:60,4. Погрешность в работе не указана, но тенденцию можно считать достоверной, поскольку в опыте было использовано 32 тысячи особей. В среде с «утяжеленной» водой, содержавшей 2 и 3 % дейтерия, напротив, количество самцов увеличивается, а соотношение самцов и самок оказалось равным 56:44 и 53:47 соответственно.

Аналогично описанному выше эксперименту с ячменем и пшеницей были поставлены опыты с хлореллой [41]. После культивирования получили среднее увеличение массы хлореллы в снеговой воде на 88 % и уменьшение на 27 % в снеговой воде с добавлением 0,003 % D_2O относительно массы хлореллы в контрольном опыте. Таким образом, еще раз подтверждается именно специфичность действия малых концентраций дейтерия в воде. Авторы работы [41] обратили также внимание на возможные демографические последствия вариаций изотопного состава питьевой воды. Так, например, число долгожителей с возрастом более 100 лет на 10^6 человек в среднем по РФ составляет 81 человек, в то время, как в Чечено-Ингушетии – 353, а в Якутии 324 человека. Первые из группы долгожителей пьют талую воду из горных рек, а вторые снеговую воду длительное время в течение года. Конечно, приведенные статистические данные можно объяснять и другими причинами, но отмеченная корреляция, безусловно, заслуживает внимания.

Известна еще одна работа [42], в которой показано, что овес быстрее прорастает в воде, полученной из антарктического льда, облегченного по кислороду на 49 % и по дейтерию на 400 % относительно стандарта SMOW.

На наш взгляд, основным недостатком вышеописанных работ является отсутствие зависимостей наблюдаемых эффектов от концентрации дейтерия в воде. Очевидно, что эта зависимость должна быть немонотонна, поскольку большие концентрации дейтерия всегда приводят к ингибированию, а малые могут оказывать активирующее действие. Поэтому выбор одной произвольной концентрации дейтерия в опытах с организмами, имеющими различную чувствительность к изменениям изотопного состава воды, может привести к различным, в том числе и незначимым результатам.

Продолжая это направление исследований в широком диапазоне концентраций дейтерия в воде, мы обнаружили, что наряду с ингибированием гидролитической активности мембранного препарата Na, K-АТФазы высокими концентрациями D_2O, наблюдается значительная активация фермента при концентрациях дейтерия менее 1 % [43]. Важно, что активационный эффект наблюдается при физиологической температуре, но отсутствует при температуре 13 ^{0}C [44]. Аналогичная бифазная картина наблюдается для мембранного препарата Ca-АТФазы, но активация при малых концентрациях дейтерия у миозиновой АТФазы отсутствует. Очевидно, что молекулярные механизмы действия высоких и низких концентраций дейтерия в воде различны, а для

появления активации фермента в данной модели требуется наличие белка, липида и воды. В продолжение этих исследований были изучены процессы регенерации морских гидроидных полипов в воде с переменным содержанием дейтерия. Чтобы учесть эффекты, связанные с распреснением морской воды, вместо D_2O в контрольные образцы добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды. В результате, был также обнаружен бифазный ответ, т.е. ингибирование высокими концентрациями дейтерия и значительная активация малыми добавками D_2O [45].

Еще в 30-е годы полярники обнаружили бурное цветение планктона у кромки льдов в арктических морях. В то время доминирующей точкой зрения на причину этого феномена были особые свойства талой воды, сохранившей структуру льда и обладающей, по этой причине, активирующим биологическим действием. Изучение вертикальной структуры изотопного состава льда и его связь с содержанием фитопланктона была выполнена на дрейфующей станции СП-22. В кернах льда мощностью около трех метров послойно исследовали изотопный состав растаявшей воды, который оказался периодически изменяющимся по толщине льда вследствие его генезиса при смене сезонов («облегчение» за счет выпадающего снега и «утяжеление» за счет намерзания из океанской воды) [46]. Измерения оптических спектров образцов из керна льда позволило определить количество сине-зеленых и зеленых микроводорослей. Оказалось, что минимальное количество фитопланктона содержится в воде с изотопным составом, соответствующем изотопному составу древнего океана, а при уменьшении и увеличении количества тяжелых изотопов воды наблюдается увеличение концентрации водорослей [47, 48]. Как уже упоминалось ранее биологическую активность талой воды из снега можно устранить соответствующей добавкой D_2O [39-41]. Поэтому можно считать, что вспышка жизни на границе тающего льда обусловлена изменением изотопного состава воды.

В 90-х годах стала доступна вода, обедненная дейтерием, и появились работы, свидетельствующие о стимулирующих свойствах такой воды и даже ее использовании для терапии онкологических заболеваний [49, 50]. Таких работ с оптимистическим результатом довольно много, но в них не исследуется зависимость от концентрации дейтерия в используемой воде. Поэтому сошлемся лишь на последний обзор [51] и наиболее интересные, с нашей точки зрения, работы [52, 53]. Нами были изучены изотопные эффекты дейтерия воды в широком диапазоне концентраций от 4ppm на биологических объектах разных уровней организации с целью выявления возможных общих закономерностей. Объектами исследований послужили: Na, K- АТФ-аза из солевых желез утки, сперматозоиды быка, человека, лягушки, икринки и сперматозоиды вьюна, роговые катушки, семена амаранта, кресс-салата и пшеницы, ряска [54]. Полученные результаты показывают, что биологические объекты чувствительны к вариациям изотопного состава воды вблизи ее природного содержания. Уменьшение содержания дейтерия в воде, как и его небольшое увеличение, может приводить как к активации, так и ингибированию биологических функций. Величины биологических изотопных эффектов, обусловленных малыми вариациями концентрации дейтерия, могут превышать известные эффекты, наблюдаемые в тяжелой воде с высокой концентрацией дейтерия.

В качестве итога рассмотрения биологического действия малых вариаций изотопного состава воды около ее природного содержания, а также воды обедненной дейтерием можно утверждать, что в интервале концентраций дейтерия от 4 ppm до 10000 ppm (1 %) можно получить как активацию, так и ингибирование в живых и модельных системах. В отличие от высоких концентраций дейтерия в воде, ингибирующих разнообразные биологические процессы, говорить об универсальном активирующем влиянии воды с уменьшенной концентрацией дейтерия некорректно.

Список литературы / References:

1. Lewis G.N. The biochemistry of water containing hydrogen isotope. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, vol. 55, no. 8, pp. 3503-3504.

2. Taylor H.S., Swingle W.W., Eyring H., Frost A.A. The effect of water containing the isotope of hydrogen upon fresh water organisms. *J. Cell Comp. Physiol.*, 1933, vol. 4, no. 1, p.1-8.

3. Lewis G.N. The biology of heavy water. *Science*, 1934, no. 2042, pp. 151-153.

4. Crespi H.L., Archer S.M., Katz J.J. Cultivation of microorganisms in heavy water. *Nature*, 1959, vol. 184, no. 4687, pp. 729-730.

5. Хлебович В.В. *Акклимация животных организмов.* Л: Наука, 1981, 136 с. [Khlebovich V.V. *Acclimation of animal organisms.* L: Nauka, 1981, 136 p. (In Russ.)]

6. Рогинский С.З., Шноль С.Э. *Изотопы в биохимии.* М: Изд. АН СССР, 1963, 380 с. [Roginsky S.Z., Shnoll S.E. *Isotopes in biochemistry.* M: AS USSR, 1963, 380 p. (In Russ.)]

7. Лобышев В.И., Калиниченко Л.П. *Изотопные эффекты D_2O в биологических системах*. М., Наука, 1978, 213 с. [Lobyshev V.I., Kalinichenko L.P. *Isotope effects of D_2O jn biological systems*. M., Nauka, 1978, 213 p. (In Russ.)]

8. Никитин Д.И., Оранская М.Н., Лобышев В.И. Специфичность отклика бактерий на вариации изотопного состава воды. *Биофизика*, 2003, т. 48, вып. 4, с. 678-682. [Nikitin D.I., Oranskaya M.N., Lobyshev V.I . The specificity of response of bacteria to variations in the isotopic content of water. *Biophysics*, 2003, vol. 48, no. 4, pp. 678-682. (In Russ.)]

9. Косенков А.В., Гуляев М.В., Лобышев В.И., Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П. Обратимое дейтерирование тканевой жидкости и биополимеров в нормальных и опухолевых тканях мышей. *Биофизика*, 2018, т. 63, вып. 4. [Kosenkov A.V., Gulaev M.V., Lobyshev V.I. [et al.] Reversible Deuterium Exchange of Tissue Fluid and Biopolymers in Normal and Tumor Tissue of Mice. *Biophysics*, 2018, vol. 63, no. 4 (In Russ.)]

10. Lobyshev V.I., Gianic T., Masarova M. Changes in vesicular membrans ESR spin label parameters upon isotope solvent substitution. *General Physiology and Biophysics*, 1987, no. 6, pp. 297-302.

11. Lobyshev V.I. Proton inventory method in thermodynamics of heat transition in biopolymers. In *"Water and Ions in Biological Systems"*. Ed. By P. Lauger, L. Packer, V. Vasilescu. Birkhauser Verlag, Basel, 1988, pp. 381-386.

12. Лобышев В.И., Вишневская З.И. Анализ кинетических изотопных эффектов в смесях H_2O-D_2O в ферментативном катализе. Способ выявления роли конформационно-динамических процессов. *Биофизика*, 1984, т. 29, вып. 2, с. 184-189. [Lobyshev V.I., Vishnevskaya Z.I. Analysis of kinetic isotope effects in H_2O- D_2O mixtures in the enzyme catalysis – detection of conformational-dynamic processes. *Biophysics*, 1984, vol. 29, no. 2, p. 184-189. (In Russ.)]

13. Gurwitch A.G. *Hystologischen Grundlagen der Biologie*, Iena, Fisher, 1930, pp. 310.

14. Lobyshev V.I., Li Qingguo, Cheng Jiji. The solvent isotopic effect of heavy water on kinetics of the intermediates M412 and O640 of bacteriorhodopsin photocycle. *J. Fudan Univ. (Natural Sci.), China*, 1990, vol. 29, no. 3, pp. 327-334.

15. Ферронский В.И., Поляков В.А. *Изотопия гидросферы Земли.* М., Научный мир, 2009, 632 с. [Ferronsky V.I., Polyakov V.A. *Isotopy of the Earth hydrosphere.* M., Nauchny mir, 2009, 632 p. (In Russ.)]

16. Barnes T.C. A possible physiological effect of the heavy isotope of H in water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, vol. 55, no. 10, pp. 4332-4333.

17. Barnes T.C. Futher observation on the physiological effect on the heavy hydrogen isotope on Spirogyra. *Amer. J. Botany*, 1933, vol. 20, no. 10, p. 181-182.

18. Barnes T.C., Larson E.J. Futher experiments on the physiological effect of heavy water and of ice water. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, vol. 55, no. 12, pp. 5059-5060.

19. Barnes T.C. The effect of heavy water of low concentration on Euglena. *Science*, 1934, vol. 79, no. 2050, p. 370.

20. Barnes T.C. Alleged simulation of moulds by paraffin in heavy water. *Nature*, 1934, vol. 134, no. 3389, pp. 573-574.

21. Barnes T.C., Larson E.J. The effect of heavy water of low concentration on Spirogyra, Planaria and enzyme action. *Protoplasma*, 1934, Bd. 22, H. 3, pp. 431-443.

22. Barnes T.C., Jahn T.L. Properties of water of biological interest. *Quart. Rev. Biol.*, 1934, vol. 9, no. 3, pp. 292-341.

23. Barnes T.C., Gaw H.Z. The chemical basis for some biological effects of heavy water. *J. Amer. Chem. Soc.,* 1935, vol. 57, no. 3, pp. 590-591.

24. Richards O.W. The growth of yeast in water containing deuterium. *Amer. J. Botany*, 1933, vol. 20, no. 10, pp. 679-680.

25. Richards O.W. The effect of deuterium on the growth of yeast. *J. Bacter.*, 1934, vol. 28, no. 3, pp. 289-294.

26. Mayer S.L. Alleged stimulation of moulds by paraffin in heavy water. *Nature*, 1934, vol. 134, no. 3391, p. 665.

27. Mayer S.L. Deuterium oxide and Aspergillus. *Science*, 1934, vol. 79, no. 2044, pp. 210-211.

28. Macht D.I., Davis M.E. Some pharmacological experiments with deuterium. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1934, vol. 56, no. 1, p. 246.

29. Fox D.L., Cupp E.E., McEwen G.F. Low concentration of deuterium oxide and the growth of marine diatoms. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1936, vol. 34, no. 5, pp. 575-581.

30. Rea C.E., Yuster S. Effect of deuterium oxide on rat sarcoma R-39. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1934, vol. 39, no. 9, pp. 1058-1060.

31. Shoup C.S., Mayer S.L. The action of deuterium oxide in low concentration on the course of gas production by brewer's yeast. *J. Tennessee Acad. Sci.*, 1935, vol. 10, no. 2, pp. 127-130.

32. Larson E.J., BarnesT.C. Parasition in heavy water of low concentration. *Nature*, 1934, vol. 133, no. 3371, pp. 873-874.

33. Terao A., Inoue Y. Effect of the heavy water on the population growth of the water-flee, Moina macrocopa strauss. *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, 1934, vol. 10, no. 8, pp. 513-514.

34. Brun J., Tronstad L. Some germination experiments with peas in heavy water. *K. Norske Vidensk. Selik. Fozhandl (Trondheim)*, 1935, vol. 7, (paper 48), pp. 171-173.

35. Curry J., Pratt R., Trelease S.F. Does dilute heavy water influence biological processes. *Science*, 1935, vol. 81, pp. 275-277.

36. Weiser H.H. Influence of deuterium oxide on growth and morphology on lactobacilli. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, 1937, vol. 36, no. 2, pp. 151-152.

37. Fox D.L. Concerning enzymic reactions in heavy water. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1935, vol. 6, no. 3, pp. 405-424.

38. Ewart A.J. The influence of heavy water on plants. *J. Exp. Biol. Med.*, 1935, vol. 13, no. 1, pp. 9-15.

39. Родимов Б.Н. Снеговая вода – стимулятор роста и продуктивности животных и растений. *Сельское хоз. Сибири*, Омск, 1961, № 7б, с. 66-69. [Rodimov B.N. Water from snow – stimulator for growth and productivity of animals and plants. *Selskoe khozyajstvo Sibiri*, Omsk, 1961, no. 7б, pp. 66-69. (In Russ.)]

40. Родимов Б.Н., Маршунина А., Яфарова И. Действие снеговой воды на живые организмы. *Сельскохозяйственное производство Сибири и Дальнего Востока.* Омск, 1965, № 4, с. 56-57. [Rodimov B.N., Marshunina A., Yafarova I. The influence of snow water on living organisms. *Selskokhozyastvennoe proizvodstvo Sibiri I Dalnego Vostoka*, Omsk, 1965, no. 4, pp. 56-57. (In Russ.)]

41. Торопцев И.В., Родимов Б.Н., Маршунина А.М., Яфарова И.О., Садовникова В.И., Лобина И.Г. Биологическая роль тяжлой воды в живых организмах. *Вопросы радиобиологии и гематологии*. Изд. Томского ун-та, 1966, с. 118-126. [Toroptsev I.V., Rodimov B.N., Marshunina A. [et al.] Biological role of heavy water in biological systems. *Voprosy radiobiologii I gematologii*, Tomsk, Tomsk Univ., 1966, pp. 118-126. (In Russ.)]

42. Gleason J.D., Friedman I. Oats may grow better in water depleted in oxygen−18 and deuterium. *Nature*, 1975, vol. 256, no. 5505, p. 305.

43. Лобышев В.И., Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Фогель Ю. Активирование Na, K-АТФазы малыми концентрациями D_2O, ингибирование-большими. *Биофизика*, 1978, т. 23, вып. 2, с. 390-391. [Lobyshev V.I., Tverdislov V.A., Vogel J., Yakovenko L.V. Activation of Na, K-ATPase by low concentrations of D_2O, inhibition by high-concentrations. *Biophysics*, 1978, vol. 23, no. 2, pp. 390-391. (In Russ.)]

44. Лобышев В.И., Фогель Ю., Яковенко Л.В., Резаева М.Н., Твердислов В.А. D_2O как модификатор ионной специфичности Na, K-АТФазы. *Биофизика*, 1982, т. 27, вып. 4, с. 595-603. [Lobyshev V.I., Vogel J., Yakovenko L.V., Rezaeva M.N., Tverdislov V.A. D_2O as a modifier of ionic specificity of Na,K-ATPase. *Biophysics*, 1982, vol. 27, no. 4, p. 595-603. (In Russ.)]

45. Лобышев В.И. Аномальное активирующее влияние тяжелой воды малой концентрации на регенерацию гидроидных полипов. *Биофизика*, 1983, т. 28, вып. 4, с. 666-668. [Lobyshev V.I. Activating influence of small concentration heavy water on the regeneration of hydroid polyp *Obelia geniculata*. *Biophysics*, 1983, vol. 28, no. 4, pp. 666-668. (In Russ.)]

46. Мельников И.А., Лобышев В.И. Фракционирование ^{18}O в снежно-ледяном покрове центрального арктического бассейна. *Океанология*, 1985, № 2, с. 237-241. [Melnikov I.A., Lobyshev V.I. Fractionating of ^{18}O within snow-ice cover in the central Arctic Ocean. *Okeanologiya*, 1985, no. 2, pp. 237-241. (In Russ.)]

47. Лобышев В.И., Мельников И.А., Есиков А.Д., Нечаев В.В. Исследование изотопного состава кислорода арктического дрейфующего льда в связи с проблемой активации роста микроорганизмов на границе тающего льда. *Биофизика*, 1984, т. 29, вып. 5, с. 835-839. [Lobyshev V.I., Melnikov I.A., Esikov A.D., Nechaev V.V. Study of oxygen isotope composition of arctic drifting ice in relation to activation of phytoplankton growth on the boundary of melting ice. *Biophysics*, 1984, vol. 29, no. 5, pp. 835-839. (In Russ.)]

48. Николаев С.Д. Изотопно-кислородная палеотермия мирового океана в мезо-кайнозое. Состояние проблемы. В кн.: *VII Всес. Симп. по стабильным изотопам в геохимии.* М., изд. АН СССР, 1978, с. 317-319. [Nikolaev S.D. Isotope-oxygen paleothermy of global ocean in meso-Cenozoic. Status of the problem. *In*.: *VII Vses. Symp. po Stabilnym isotopam v geohimii.* M., AN USSR, 1978, pp. 317-319. (In Russ.)]

49. Somlyai G., Janeso G., Jakli G., Vass K., Barna B., Lakies V., Gaal T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. FEBS, 1993, vol. 317, no. 1-2, pp. 1-4.

50. Somlyai G., Laskay G., Berkenyi T., Galbacs Z., Galbacs G., Kiss S.A., Jakli Gy., Jancso G. The biological effects of deuterium – depleted water, a possible new tool in cancer therapy. *Z. Oncol./J. Oncol.* 1998, vol. 30, no. 4, pp. 91-94.

51. Сыроешкин А.В., Титорович О.В., Плетнева Т.В., Бурдейная Т.Н. Вода, обедненная по дейтерию, как адъювантное средство при лечении онкологических заболеваний. *Микроэлементы в медицине*, 2015, т. 16, № 3, с. 29-37. [Syroeshkin A.V., Titorovich O.V., Pletneva T.V., Byrdejnaya T.N. Water depleted of deuterium as aduvant remedy for cancer therapy. *Microelementy v medicine*, 2015, vol. 16, no. 3, pp. 29-37. (In Russ.)]

52. Самков А.А., Джимак С.С., Барышев М.Г. [и др.] Влияние изотопного состава воды на продукцию биомассы *Rhodococcus erythropolis, Биофизика*, 2015, т. 60, вып.1, с. 136-142. [Samkov A.A., Dzhimak C.C., Baryshev M.G. [et al.] The influence of water isotope content on the production of biomass *Rhodococcus erythropolis, Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 136-142. (In Russ.)]

53. Strekalova T., Evans M., Chernopiatko A. [et al.] Deuterium content of water increases depression susceptibility. The potential role of a serotonin-related mechanism. *Behavioural Brain Research*, 2015, vol. 277, pp. 237-244.

54. Киркина А.А., Лобышев В.И., Лопина О.Д. [и др.] Изотопные эффекты малых концентраций дейтерия воды в биологических системах. *Биофизика*, 2014, т. 59, вып. 2, с. 399-407. [Kirkina A.A., Lobyshev V.I.,

Lopina O.D., Doronin Yu.K., Burdeinaya T.N., Chernopyatko A.S. Isotopic effects of low concentration of deuterium in water on biological systems. *Biophysics*, 2014, vol. 59, no. 2, pp. 399-407. (In Russ.)]

TALKING ABOUT THE ISOTOPIC EFFECTS OF HEAVY WATER IN BIOLOGICAL AND MODEL SYSTEMS

Lobyshev V.I.
Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory 1/2, Moscow 119991, Russia; e-mail: lobyshev@yandex.ru

Abstract. The review is given for the isotopic effects of D_2O. The general features of the biological isotope effects are pointed out – adaptation, inhibition of biochemical and physiological reactions, increased stability to high temperature and other external extremal conditions, deceleration of biological clocks, high speed of the effects appearance. Special attention is paid to unexpected effects of small concentrations of deuterium in water and deuterium depleted water.
***Key words**: D_2O, deuterium depleted water, living organisms, cells, biopolymers.*

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО ВХОДА Ca^{2+} ВО ВКУСОВЫХ КЛЕТКАХ ТИПА III

Черкашин А.П., Рогачевская О.А.
ФБГУН Институт биофизики клетки РАН
ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская обл., РФ; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com
Поступила в редакцию: 06.07.2018.

Аннотация. Вкусовые клетки типа III используют классический химический синапс для нейропередачи сенсорной информации, и стимул-зависимый вход внеклеточного Ca^{2+} через потенциал-зависимые (ПЗ) Ca^{2+}-каналы и инициируемый этим выброс нейромедиатора по механизму Ca^{2+}-зависимого экзоцитоза являются ключевыми событиями. Потенциально эффективность синаптической передачи может варьировать при изменениях внеклеточного Ca^{2+}, однако ранее мы показали, что ПЗ вход Ca^{2+} и величина Ca^{2+}-сигналов в клетках типа III остаются инвариантными при изменении внешнего Ca^{2+} в физиологическом диапазоне - это свидетельство функционирования механизма, обеспечивающего мониторинг внеклеточного Ca^{2+} и подстройку нейропередачи при его девиации. Сенсором внеклеточного Ca^{2+} может быть Ca^{2+}-чувствующий рецептор CaSR, экспрессию которого в клетках типа III мы продемонстрировали ранее. Мы предположили, что CaSR может регулировать активность ПЗ Ca^{2+}-каналов, и тогда ПЗ Ca^{2+}-токи должны быть чувствительны к агонистам/антагонистам этого рецептора. Регистрация ПЗ-токов в клетках типа III в цезиевых условиях показала наличие входящего Ca^{2+}-тока. Специфический агонист CaSR NPSR-568 подавлял этот ток, что можно было бы объяснить влиянием рецептора CaSR на активность ПЗ Ca^{2+}-каналов. Однако эффекты развивались быстро и были необратимы, указывая на возможность неспецифического действия. NPSR-568 ингибировал ПЗ-токи в клетках типа II, в которых рецептор CaSR не функционирует, подтверждая влияние этого соединения непосредственно на ПЗ-токи. Ряд других лигандов CaSR так же оказывал подобное неспецифичное действие на ПЗ-токи клеток типа III и II. В качестве альтернативы неоднозначным физиологическим данным нами предложена математическая модель, в которой постулируется, что внеклеточный Ca^{2+} влияет на уровень ПЗ Ca^{2+}-тока не только как носитель тока, но и как CaSR-опосредованный регулятор ПЗ Ca^{2+}-каналов. При определенных параметрах модель достаточно точно воспроизводит полученную экспериментальную зависимость величины ПЗ Ca^{2+}-тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+}.
Ключевые слова: *вкусовые клетки, ПЗ Ca^{2+}-каналы, рецептор внеклеточного Ca^{2+}, кальциевая сигнализация, нейропередача.*

Во вкусовой почке – периферическом органе вкуса – только вкусовые клетки типа III образуют классические химические синапсы, в которых осуществляется кальций-зависимый выброс нейромедиатора, передающего информацию о вкусовом стимуле окончаниям вкусового нерва и далее в мозг. Когда вкусовые вещества кислой модальности (и, возможно, ряд ионных стимулов [1, 2]) достигают апикальной части клеток типа III, эти клетки генерируют потенциал действия, что приводит к активации потенциал-зависимых (ПЗ) Ca^{2+}-каналов, входу внешнего Ca^{2+}, повышению Ca^{2+} в цитоплазме, и стимуляции экзоцитоза [3, 4], благодаря чему происходит выброс нейромедиатора в синаптическую щель, что активирует рецепторы постсинаптической мембраны окончаний вкусового нерва. Очевидно, что повышение Ca^{2+} в цитоплазме является ключевым моментом вкусовой нейротрансмиссии и должно быть защищено от неспецифических внешних воздействий, например, изменения ионного состава в синаптической щели и межклеточного раствора вследствие электрической активности клеток, в частности, происходящего перераспределения ионов Ca^{2+} между клетками и межклеточным пространством и падение его концентрации в последнем. Можно предположить, что при физиологическом снижении внеклеточного Ca^{2+} потенциально может изменяться эффективность синаптической передачи. Ранее мы показали, что изменение концентрации ионов Ca^{2+} снаружи клетки в физиологическом диапазоне не приводит ни к падению амплитуды (ПЗ) Ca^{2+}-тока, ни к снижению амплитуды Ca^{2+}-сигнала в цитоплазме клеток, это свидетельствовало о том, в этих вкусовых клетках функционирует механизм, обеспечивающий мониторинг внеклеточного Ca^{2+} и обеспечивающий подстройку нейропередачи при его девиации. Сенсором внеклеточного Ca^{2+} может быть Ca^{2+}-чувствующий рецептор CaSR (extracellular calcium sensing receptor), экспрессия которого во вкусовых клетках типа III была продемонстрирована нами ранее [5], и описано его участие в регуляции ионного транспорта [6] и синаптической передачи [7]. Поэтому мы предполагаем, что CaSR может регулировать активность ПЗ Ca^{2+}-каналов, а следовательно, быть звеном механизма поддержания постоянства ответов клеток типа III. Если наше предположение верно, то можно ожидать, что ПЗ Ca^{2+}-токи и ПЗ внутриклеточные Ca^{2+}-сигналы должны быть чувствительны к агонистам/антагонистам этого рецептора и модуляторам сопряженных с CaSR сигнальных белков. В настоящей работе мы проводили экспериментальную проверку этой идеи, анализируя зависимость амплитуды ПЗ Ca^{2+}-токов во вкусовых клетках типа III от воздействия веществ, влияющих на активность рецептора CaSR. Исследования проводились путем регистрации электрической активности вкусовых клеток методом patch-clamp с использованием ингибиторного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение вкусовых почек и клеток проводилось по стандартной методике [8] из языка мышей (10-14 мес). Смесь ферментов (0,9 мг/мл коллагеназы Б, 1,2 мг/мл диспазы II, 0,2 мг/мл эластазы, 0,5 мг/мл ингибитора трипсина), растворенных в среде (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES (pH 7,4), инъецировалась под эпителий отделенного языка, который затем инкубировался 25 минут при температуре 25 ^{0}C в бескальциевом растворе, содержащем (мМ): 120 NaCl, 20 KCl, 0,7 $CaCl_2$, 1,1 $MgCl_2$, 1 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES, 10 глюкозы, pH 7,4. Отделенный от мышечной ткани языковый эпителий с вкусовыми сосочками 20 минут инкубировался в бескальциевом растворе для дополнительной деструкции межклеточных связей во вкусовой почке, и затем помещался в физиологический раствор, содержащий (мМ): 130 NaCl, 10 $NaHCO_3$, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 10 HEPES, 5 глюкозы, 2 Na-пирувата, pH 7,4. Вкусовые клетки вытягивали из вкусовой ткани с помощью стеклянной пипетки с диаметром кончика 70-90 мкм и затем помещали в перфузируемую экспериментальную камеру. ***Электрическую активность*** вкусовых клеток регистрировали методом patch-clamp в конфигурации perforated patch с использованием усилителя Axopatch 200 B, ЦАП-АЦП конвертера Digidata 1440A и пакета лицензионных программ pClamp10.3 (все Axon Instruments, Сингапур). Клетки в электрофизиологической камере визуализовали с использованием микроскопа Axioscop-2 (Carl Zeiss, Германия) и объектива LD A-Plan ×32. Базовый внутриклеточный раствор содержал, мМ: 140 CsCl, 1 $MgCl_2$, 0.1 EGTA, 10 HEPES-CsOH, Amphotericin B (400 мкг/мл), pH 7,3. Базовый внеклеточный раствор содержал, мМ: 135 NaCl, 5 KCl, 0,8 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES-NaOH (NaOH), pH 7,4. Система перфузии [9] обеспечивала смену раствора камеры со скоростью 0,1-1 мл/с. Опыты проводили при комнатной температуре 22-24 °C. Соли и реагенты приобретались в Sigma–Aldrich, Wortington, Molecular Probes, Tocris (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения типа вкусовой клетки ранее в нашей лаборатории были разработаны электрофизиологические [10, 11] тесты, позволяющие уверенно определить тип (I – III) клетки, и эксперименты всегда проводились на идентифицированных вкусовых клетках. Следует отметить, что регистрация ПЗ Ca^{2+}-токов связана с рядом трудностей, для решения которых нами был подобран ряд условий. Для исследований токовых характеристик клеток применялась конфигурация perforated patch [12], что предотвращает потерю внутриклеточных компонент и ассоциированную с этим инактивацию ПЗ Ca^{2+}-каналов; так же вкусовые клетки прединкубировались в присутствии проникающего агента BAPTA-AM (10 мкМ) в течение 10 мин, что снижало концентрацию внутриклеточного Ca^{2+}, который регулирует активность ПЗ Ca^{2+}-каналов. Регистрацию электрической активности проводили в условиях диализа клеток раствором, содержащим 140 мМ CsCl, что обеспечивало подавление выходящих токов через ПЗ K^+-каналы и позволяло регистрировать относительно небольшие входящие токи через ПЗ Ca^{2+}-каналы.

Деполяризация клеток типа III в условиях перфузии раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мМ $CaCl_2$, вызывала быстрые входящие ПЗ Na^+-токи, блокируемые тетродотоксином (TTX), и медленно инактивирующиеся входящие ПЗ Ca^{2+}-токи небольшой амплитуды (10-30 пА), маскируемые электрическими шумами (рис. 1а). Хорошо различимы ионные токи через ПЗ Ca^{2+}-каналы были в условиях блокады ПЗ Na^+-токов TTX и при использовании в качестве носителя тока ионов Ba^{2+} (4-10 мМ) (рис. 1б), для чего Ca^{2+} в наружном растворе заменялся на Ba^{2+}. Вольт-амперные (I-V) характеристики этих токов показывали, что они переносятся преимущественно через высокопороговые ПЗ Ca^{2+}-каналы (рис. 1в, кривая с черными кружками).

Было отмечено, что ионы Cd^{2+} в концентрации до 50 мкМ (рис. 1в, кривая с белыми кружками) полностью блокировали ПЗ Ca^{2+}-проводимость, и после отмыва токи восстанавливались до первоначальной амплитуды при кратковременной (до 30 с) аппликации блокатора. Этот критерий позволил количественно оценить относительно небольшие ПЗ Ca^{2+}-токи как разность Ca^{2+}-токов, регистрируемых в присутствии/отсутствие 50 мкМ Cd^{2+}.

После подбора условий для уверенной регистрации ПЗ Ca^{2+}-токов, мы исследовали влияние активности рецептора CaSR на ПЗ токи в клетках типа III, для чего вкусовые клетки деполяризовались в присутствии специфических агонистов/антагонистов рецептора CaSR (рис. 2а, б, рис. 3а, б). В природе помимо ионов Ca^{2+} его агонистами являются другие дивалентные катионы, аминокислоты и пептиды [5-7], так же в настоящее время есть ряд синтетических узконаправленных агонистов/антагонистов этого рецептора, которые были использованы в наших экспериментах.

В условиях цезиевого диализа, регистрировавшиеся токи включали две доминантные компоненты: входящий ток, транспортирующийся через Ca^{2+}-каналы, и выходящий ток через Cl^--каналы (рис. 2а, средняя панель). В присутствии 3 мкМ NPSR-568, агониста CaSR, подавлялись обе эти компоненты (рис. 2а, нижняя панель), и это можно было интерпретировать как то, что активация рецептора CaSR контролирует активность обоих типов каналов, однако этот эффект развивался очень быстро и был необратим, что с большой вероятностью указывает на неспецифичность действия. Поэтому нами был проведен контрольный эксперимент на клетках типа II (рис. 2в, г), в которых рецептор CaSR не функционирует, но у которых есть ПЗ-каналы (ПЗ Na^+-каналы и TRPM5). Оказалось, что NPSR-568 также ингибировал ПЗ-токи в клетках типа II, подтверждая действие этого агониста не только на рецептор CaSR, но и неспецифическое непосредственное действие агониста на различные ПЗ-каналы.

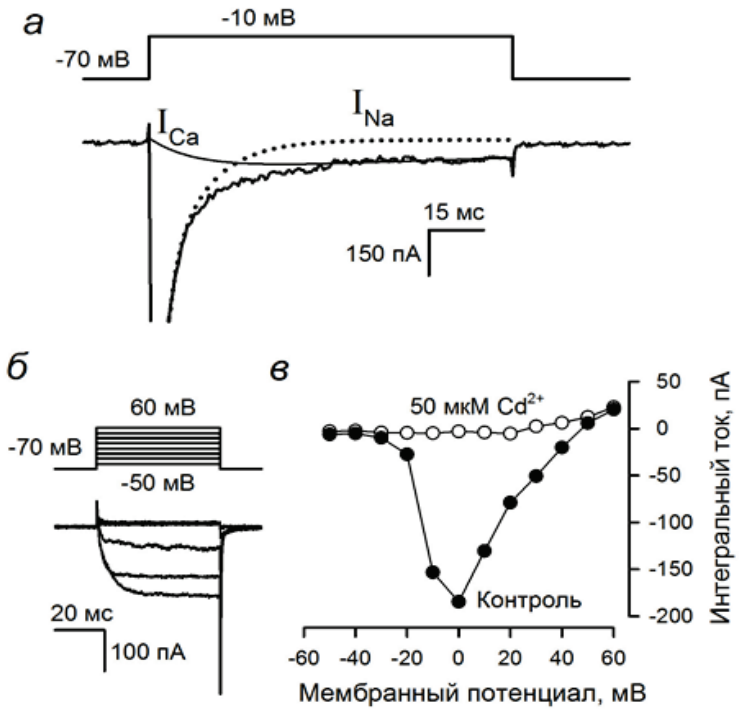


Рисунок 1. ПЗ ионные токи во вкусовых клетках типа III в условиях цезиевого диализа (140 мМ CsCl)

а – входящие Na^+ (I_{Na}, пунктирная кривая) и Ca^{2+} (I_{Ca}, тонкая линия) токи, регистрируемые от вкусовой клетки в ответ на деполяризацию импульсом –10 мВ в течение 100 мс (верхняя панель). Клетку поддерживали при потенциале -70 мВ и перфузировали раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 1 мМ $CaCl_2$

б – репрезентативное семейство Ba^{2+}-токов через ПЗ Ca^{2+}-каналы, регистрируемых от вкусовой клетки в ответ на серию деполяризующих импульсов в промежутке между -50 и 60 мВ. В наружном растворе – 140 мМ NaCl + 4 мМ $BaCl_2$ + 1 мкМ ТТХ

в – I-V характеристика стационарного Ba^{2+}-тока в контроле (семейство токов в б) и в присутствии 50 мкМ Cd^{2+} (оригинальные регистрации не показаны).

Далее было выявлено, что агонист CaSR цинакальцет (cinacalcet hydrochloride или AMG-073), который является кальцимиметиком нового поколения с лучшими фармакологическими характеристиками по сравнению с NPSR-568 [13] так же обладает сходным с NPS R-568 неспецифичным действием на ПЗ токи клеток типа III и II (Рис. 3). Позитивный аллостерический модулятор AC 265347 а так же антагонист NPS-2143 обладают сходным с NPS R-568 неспецифичным действием на ПЗ токи клеток типа III и II (данные не приведены).

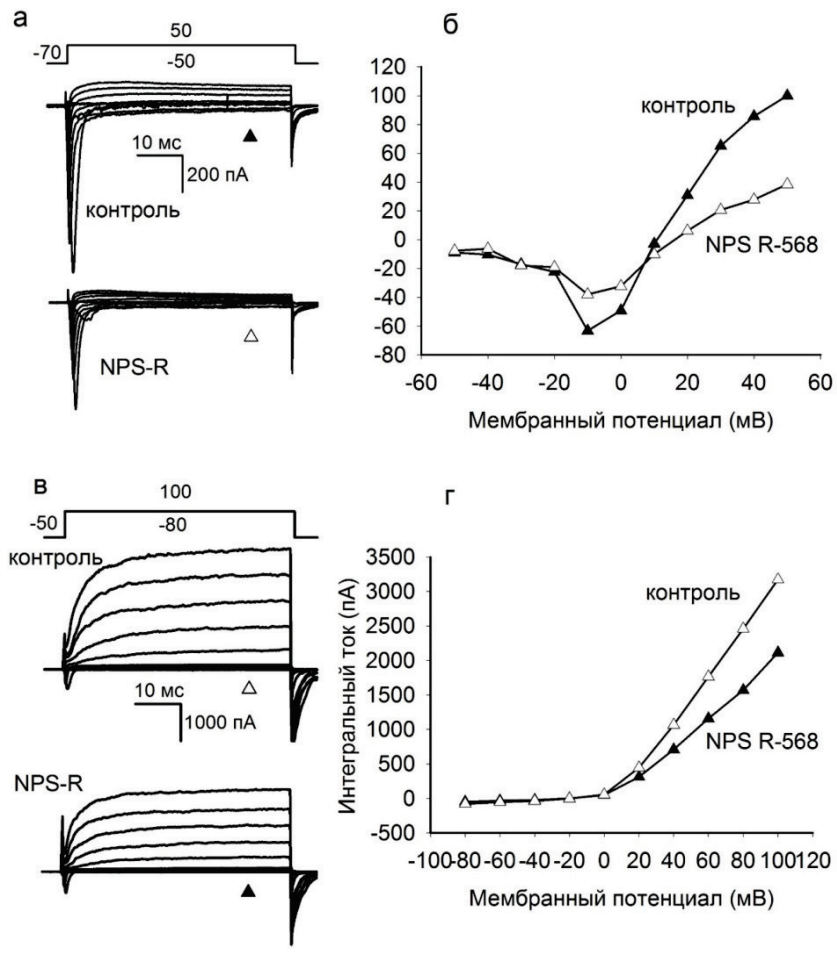


Рисунок 2. Эффекты агониста CaSR NPSR-568 на интегральные токи во вкусовых клетках в условиях цезиевого диализа

а – репрезентативные семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа III в контроле и в присутствии 3 мкМ NPSR-568. Треугольниками отмечены моменты измерений текущих значений тока для генерации I-V кривых, показанных на панели (б)

б – I-V характеристики токов, представленных в (а)

в – семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа II в контроле и в присутствии 3 мкМ NPSR-568

г - I-V характеристики токов в (в).

Клетки поддерживалась при -70 мВ, деполяризовалась 50 мс импульсами в пределах от -50/-80 мВ до 50/100 мВ, и перфузировалась раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 2 мМ CaCl2

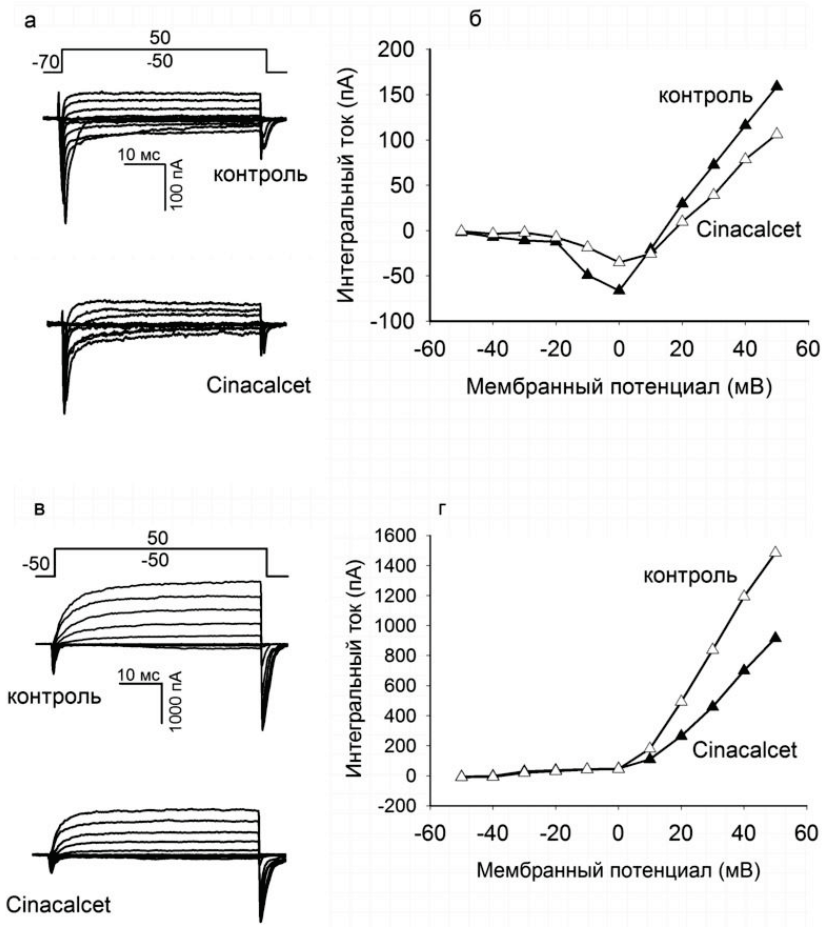


Рисунок 3. Эффекты агониста CaSR цинакальцета на интегральные токи во вкусовых клетках в условиях цезиевого диализа
а – репрезентативные семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа III в контроле и в присутствии 1 мкМ Cinacalcet.
б – I-V характеристики токов, представленных в (а)
в – семейства ПЗ-токов во вкусовой клетке типа II в контроле и в присутствии 1 мкМ Cinacalcet
г – I-V характеристики токов, представленных в (в).
Клетки поддерживалась при -70 мВ, деполяризовалась 50 мс импульсами в пределах от -50 мВ до 50 мВ, и перфузировались раствором, содержащим 140 мМ NaCl + 2 мМ $CaCl_2$

Таким образом, все, доступные на данный момент лиганды для рецептора CaSR, не обладают заявленной производителем специфичностью по отношению к другим возможным клеточным мишеням и не представляется возможным получить достоверные физиологические данные о взаимосвязи активности рецептора CaSR и ПЗ Ca^{2+} каналов во вкусовых клетках типа III.

В попытке обосновать возможность регуляции ПЗ Ca^{2+}-токов активацией рецептора CaSR мы применили математическое моделирование, в основу которого была взята модель переноса ионов, связывающихся в поре ионного канала; в этом случае ионный ток при фиксированном потенциале должен описываться кривой с насыщением типа изотермы Ленгмюра [14]. В случае одиночных Ca^{2+}-каналов величина тока через канал ***i*** описывается уравнением, подтвержденным экспериментально [15]:

$$i = i_{\max} \frac{a_{\mathrm{Ca}}}{a_{1/2} + a_{\mathrm{Ca}}}, \tag{1}$$

где a_{Ca} – активность ионов Ca^{2+}; $a_{1/2}$ – активность полуэффекта; $i_{\max}$ – величина тока при $a_{\mathrm{Ca}} \to \infty$. Интегральный ток I через N идентичных каналов связан с током через одиночный канал соотношением:

$$I = iNP, \tag{2}$$

где P – вероятность найти канал в открытом состоянии. Поскольку при миллимолярных концентрациях активность иона пропорциональна его концентрации, используя (1) и (2) можно описать зависимость интегрального Ca^{2+}-тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+} следующим уравнением:

$$I = I_{\max} P \frac{C}{C_{1/2} + C}, \tag{3}$$

где $I_{\max} = i_{\max} N$, C – концентрация внеклеточного Ca^{2+}, $C_{1/2}$ – концентрация полуэффекта.

Из уравнения (3) следует, что, если вероятность открытого состояния не зависит от внеклеточного Ca^{2+}, то интегральный ток как функция концентрации Ca^{2+} должен описываться монотонной зависимостью с

насыщением. Однако во время регистрации ПЗ Ca^{2+}-токов во вкусовых клетках типа III при девиациях Ca^{2+} во внеклеточном растворе от 0,5 до 10 мМ на возрастающей кривой зависимости ПЗ Ca^{2+}-тока от наружного Ca^{2+} было обнаружено наличие плато в области 1-2 мМ, что нельзя описать с помощью уравнения (3), поскольку плато в области 1-2 мМ Ca^{2+} невозможно воспроизвести при постоянных параметрах *Imax* и *P*. Появление плато на кривой возможно, если в определенной области $P(C)$ убывает по мере увеличения концентрации Ca^{2+}. Более того, величина $P(C)$ не должна уменьшаться до нуля, иначе невозможен рост ПЗ Ca^{2+}-тока, наблюдаемый при дальнейшем увеличении концентрации Ca^{2+}. Учитывая эти соображения, а также то, что CaSR кооперативно стимулируется Ca^{2+} [5], мы рассмотрели следующую зависимость:

$$P(C) = P_0 - P_1 \frac{C^n}{K_{1/2}^n + C^n}, \quad (4)$$

где P_0 и P_0–P_1 – вероятности открытого состояния в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} и при насыщающих концентрациях, соответственно; $K_{1/2}$ – концентрация полуактивации рецептора CaSR. Комбинируя уравнения (3) и (4), мы получаем следующую зависимость для интегрального тока как функции концентрации внеклеточного Ca^{2+}:

$$I(C) = I_{\max} P_0 (1 - \delta \frac{C^n}{K_{1/2}^n + C^n}) \frac{C}{C_{1/2} + C}, \quad (5)$$

где $\delta = P_1/P_0$.

Поскольку уровень ПЗ Ca^{2+}-токов различался для индивидуальных клеток, для сравнения результатов отдельных экспериментов Ca^{2+}-токи при разных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} нормировали на величину тока при 1 мМ Ca^{2+}, которую принимали за единицу. Для нормированного тока справедливо следующее выражение:

$$I(C)/I(1) = A(1 - \delta \frac{C^n}{K_{1/2}^n + C^n}) \frac{C}{C_{1/2} + C}, \quad (6)$$

где $A^{-1} = \frac{(1 - \delta/(K_{1/2}^n + 1)}{C_{1/2} + 1}$.

Опираясь на данные работы [15], мы зафиксировали $C_{1/2}$ = 14 мМ и варьируя остальные параметры (δ, $K_{1/2}$ и n) в уравнении (6) выяснили, что при определенных значениях параметров это уравнение действительно воспроизводит плато экспериментальной кривой зависимости ПЗ Ca2+-тока от наружного Ca2+ и в целом удовлетворительно описывает экспериментальную зависимость ПЗ тока от концентрации внеклеточного Ca^{2+}. Это позволяет рассматривать полученные экспериментальные данные и результаты моделирования как свидетельство в пользу того, что гептаспиральный рецептор CaSR может обеспечивать инвариантность ПЗ Ca^{2+}-токов во вкусовых клетках типа III в условиях, когда наружный Ca^{2+} варьирует в физиологически уместном диапазоне концентраций.

Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01941-а.

Список литературы / References:

1. Chaudhari N., Roper S.D. The cell biology of taste. *J. Cell Biol.*, 2010, vol. 190, pp. 285-296.

2. Huang Y.A., Maruyama Y., Stimac R., Roper S.D. Presynaptic (type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J. Physiol.*, 2008, vol. 586, pp. 2903-2912.

3. Vandenbeuch A., Zorec R., Kinnamon S.C. Capacitance measurements of regulated exocytosis in mouse taste cells. *J. Neurosci.*, 2010, vol. 30, pp. 14695-14701.

4. Huang Y., Pereira E., Roper S.D. Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS One*, 2011, vol. 6 (10), pp. e25471.

5. Bystrova M.F., Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Churbanov G.D., Kolesnikov S.S. Functional expression of the extracellular Ca^{2+}-sensing receptor in mouse taste cells. *J. Cell Sci.*, 2010, vol. 123, pp. 972-982.

6. Conigrave A.D., Ward D.T. Calcium-sensing receptor (CaSR): Pharmacological properties and signaling pathways. *Best Pract. Res. Clin. Endocrin. Metab.*, 2013, vol. 27, pp. 315-331.

7. Chen W., Bergsman J.B., Wang X., Gilkey G., Pierpoint C.-R., Daniel E.A., Awumey E.M., Dauban P., Dodd R.H., Ruat M., Smith S.M. Presynaptic external calcium signaling involves the calcium-sensing receptor in neocortical nerve terminals. *PLoS One.*, 2010, vol. 5 (1), pp. e8563.

8. Baryshnikov S.G., Rogachevskaja O.A., Kolesnikov S.S. Calcium signaling mediated by P2Y receptors in mouse taste cells. *J. Neurophysiol.*, 2003, vol. 90, pp. 3283-3294.

9. Kolesnikov S.S., Margolskee R.F. Extracellular K^+ activates a K^+ - and H^+ -permeable conductance ion frog taste receptor cells. *J. Physiol.*, 1998, vol. 507, pp. 415-432.

10. Romanov R.A., Kolesnikov S.S. Electrophysiologically identified subpopulations of taste bud cells. *Neurosci. Lett.*, 2006, vol. 395. pp. 249-254.

11. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jeang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.*, 2007, vol. 26 (3), pp. 657-667.

12. Horn R., Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.*, 1988, vol. 92, pp. 145-159.

13. Filopanti M., Corbetta S., Barbieri A.M., Spada A. Pharmacology of the calcium sensing receptor. *Clin. Cases Miner Bone Metab.*, 2013, vol. 10 (3), pp. 162-165.

14. Hille B. *Ion channels in excitable membranes*. 3d ed. Sunderland: Sinauer Assocociates, Inc., 2001, 814 p.

15. Hess P., Lansman J.B., Tsien R.W. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *J. Gen. Physiol.*, 1986, vol. 88, pp. 293-319.

POSSIBLE MECHANISMS MEDIATING THE REGULATION OF THE POTENTIAL DEPENDED CA^{2+} INFLUX IN TYPE III TASTE CELLS.

Cherkashin A.P., Rogachevskaya O.A.

Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences

Institutional Street, 3, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Abstract. Afferent output in Type III taste cells involves the classical chemical synapse, wherein Ca^{2+} entry through voltage-gated (VG) Ca^{2+}-channels triggers Ca^{2+}-dependent exocytosis of a neurotransmitter. In taste bud, extracellular Ca^{2+} may vary, thus affecting the efficacy of the synaptic transmission. As demonstrated earlier, VG Ca^{2+} influx and associated intracellular Ca^{2+} transients were apparently invariant when bath Ca^{2+} varied in a physiological range. This finding argued that in Type III taste, a mechanism exists to sense variability of extracellular Ca^{2+} and to provide the proper adjustment of neurotransmission. Previously, we found that extracellular Ca^{2+}-sensing receptor (CaSR) is functionally expressed in Type III cells, where one might serve as a sensor of extracellular Ca^{2+} and a regulator of activity of VG Ca^{2+}-channels. If so, VG Ca^{2+}-currents and related intracellular Ca^{2+} signals should have been sensitive to agonists/antagonists of this receptor. In Type III cells dialyzed with CsCl, we detected VG Ca^{2+}-currents. The specific CaSR agonist NPSR-568 suppressed these currents, implicating CaSR in control of their activity. However, the effects of NPSR-568 were apparently instant and irreversible, suggesting its action to be unspecific. NPSR-568 also inhibited VG-currents in Type II cells, wherein CaSR is not expressed. Given this fact and that the other ligands exerted similar inhibitory effects, the effects of CaSR ligands appeared to be unspecific. Since our inhibitory analysis failed, we employed a mathematical model that postulated that extracellular Ca^{2+} determines VG Ca^{2+} currents not only as a carrier but also as an CaSR agonist. At certain parameters, the model accurately reproduced the experimental dependence of the VG Ca^{2+} current on extracellular Ca^{2+}.

Key words: *taste cells, VG Ca^{2+}-channels, extracellular Ca^{2+}-sensing receptor, calcium signalization, neurotransmission.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАШИНЫ КАК ИЕРАРХИЧЕСКИЕ ХИРАЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ

Малышко Е.В., Твердислов В.А.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

ул. Ленинские горы, 1, корп. 2, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: katyamalyshko@mail.ru, tverdislov@mail.ru

Поступила в редакцию: 07.07.2018.

Аннотация. Молекулярные машины являются важнейшим физическим атрибутом живых систем и представляют собой иерархически организованные конструкции. Обосновывается концепция, согласно которой хиральный дуализм углеродных соединений является физической симметрийной основой структурообразования в молекулярной биологии, а гомохиральность аминокислот, рибозы и дезоксирибозы является ресурсом свободной энергии и инструментом стратификации внутримолекулярных и надмолекулярных структурных уровней. Обсуждаются причины и особенности чередования знака хиральности внутримолекулярных структурных уровней L-D-L-D для белков и D-L-D-L для ДНК. Фолдинг в макромолекулах рассмотрен как автоволновой процесс самоорганизации в активных средах с изменяющейся размерностью. Отмечено, что при межмолекулярных взаимодействиях в каждой из названных биомакромолекул доминирует знак хиральности внутримолекулярной структуры высшего уровня, непосредственно участвующей во взаимодействиях. Введение общего симметрийного фактора – хиральности - в рассмотрение пространственной организации макромолекул позволяет единым образом как периодическую систему хиральных структур рассмотреть физическую природу иерархий, а также пространство превращений и взаимодействий веществ в метаболизме и биосинтезе. Обосновывается точка зрения, согласно которой знакопеременная хиральная иерархичность сопряженных уровней макромолекулярных структур в белках и нуклеиновых кислотах имеет общебиологическую значимость: обуславливает их дискретность, служит инструментом фолдинга, структурной основой «выделенных механических» степеней свободы в конструкциях макромолекулярных машин, а также одним из механизмов блочного/сальтаторного развития эволюционного процесса.

Ключевые слова: *хиральность, структурные уровни, спирали, суперспирали, фолдинг, автоволновая самоорганизация, молекулярные машины.*

Выяснение физических принципов и механизмов формирования структурных иерархий в биомакромолекулах как конструкциях, позволяющих им выполнять функции молекулярных машин, остаётся важнейшей проблемой современной молекулярной биофизики. В этой общей проблеме имеется целый ряд неясных вопросов. В частности, это вопрос о природе фолдинга в молекулах белков и нуклеиновых кислот [1-3], вопрос о физических критериях стратификации структурных уровней в макромолекулах (не о феноменологии, что известно) [4]. Это и фундаментальный вопрос о физической природе «выделенных механических степеней свободы», которые позволяют макромолекулам выполнять специфические функции молекулярных машин как преобразователей энергии, вещества, информации [5, 6].

Следуя за физикой и химией, биология стала рассматривать процессы, происходящие на всех уровнях организации живой материи, с позиций термодинамики, неявно опираясь на образ «стрелы времени». Однако, физика видит в эволюции материи ещё и «стрелу симметрий», о которой, не называя её, образно сказал Фриман Дж. Дайсон: «Развитие Вселенной с момента ее возникновения выглядит как непрерывная последовательность нарушений симметрии… Феномен жизни естественно вписывается в эту картину». Эти два фактора эволюции систем, как очевидно, связаны между собой, но никоим образом не сводятся друг к другу. Наше исследование непосредственным образом иллюстрирует эту точку зрения.

Симметрии.

Нам представляется, что в основе названных выше проблем лежат физические явления, в самом общем виде сводящиеся к идее соотношения и нарушения симметрий в молекулярно-биологических структурах. Современная теоретическая физика ищет объяснения структуры материи, пространства-времени и взаимодействий в теории (супер)струн, основанной на гипотезе о том, что все элементарные частицы и их фундаментальные взаимодействия возникают в результате колебаний и взаимодействий ультрамикроскопических одномерных квантовых струн на масштабах порядка планковской длины 10^{-35} м. Подход принципиальным образом связан с представлениями о симметриях и их нарушениях [7]. Существенным образом здесь затребованы идеи зеркальной симметрии и её нарушения, явления хиральности. На наш взгляд, идеи внутренней симметрии и хиральности столь же важны и необходимы в объяснении природы живой материи, как и в фундаментальной теоретической физике. В молекулярной биологии, когда мы говорим о информационно детерминированных структурах молекулярных машин – белков и нуклеиновых кислот – мы также имеем дело с первичными одномерными хиральными структурами. Речь совсем не идет о прямой аналогии, но определенные ассоциации заведомо возникают.

Симметрии и нарушения симметрии составляют физическую основу периодической структуры всей молекулярной биологии, системную основу дискретности строения и функционирования живых систем, их

происхождения и эволюции. Одной из основополагающих категорий в системе симметрий-асимметрий для живых систем является понятие хиральности. В научной литературе обсуждается исключительно проблема возникновения зеркальной диссимметрии в мире углеродных соединений живой природы. Мы же поднимаем не менее важную физическую проблему относительно роли и биологического значения явления хиральности в молекулярной биологии. По уровню значимости, как нам представляется, явление хирального дуализма для молекулярной биологии сопоставимо с понятием спина в квантовой механике. Хотя бы уже потому, что в основе механической упругости физических структур атомного и макромолекулярного уровня лежат эти свойства материи.

Фолдинг.

Ранее нами было показано, что иерархии первичной, вторичной и т.д. структур белков и нуклеиновых кислот характеризуются сменой размерности – типов симметрии, увеличением масштабов и чередованием знаков хиральности, определяющих их физические особенности и молекулярно-биологические функции [4, 8, 9]. В макромолекулярных системах нуклеиновых кислот и белков были впервые выделены как целое, как хиральные инварианты молекулярной биологии знакопеременные иерархии хиральных структур в последовательностях от «нижнего» ассиметричного атома углерода в sp3-гибридизации до суперспиралей и надмолекулярных структур. Отмечено чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК. Две базовые первичные полимерные цепочки ДНК составлены молекулами D-дезоксирибозы. Цепочки соединены нуклеиновыми основаниями в «левой» гош-конформации, а все вместе они образуют известную «правую» двойную спираль ДНК. У бактерий кольцевая «правая» спираль скручивается в «левую» суперспираль. У эукариот «правая» двойная спираль ДНК обвивает гистоновый октамер «левым» образом.

Первичная структура белков образована последовательностью «левых» аминокислотных остатков. Образуя вторичные структуры, они скручиваются в «правые» α-спирали, которые, в свою очередь, сворачиваются в букеты «левых» суперспиралей. Четвертичные структуры белков, собирающиеся уже из самостоятельных молекул, снова образуют «правые» витые конструкции. У белков последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии: L-D-L-D.

В целом, можно считать, что с точки зрения хиральности молекулярная биология является периодической системой иерархий знакопеременных хиральных структур, а центральный блок, состоящий из четырех структурных уровней белков и ДНК, образует замкнутый ахиральный инвариант. Им завершается уровень молекулярной биологии, начинается цитологический уровень со своими симметрическими особенностями.

Хиральность – дуалистическое свойство, определяющее, как мы теперь понимаем, не только особенности статической пространственной иерархической организации макромолекул, но и траекторию процессов их пространственной самоорганизации – фолдинга. Гомохиральность первичной структуры белков, составленной левыми аминокислотными остатками, или цепочки правых молекул (дезокси)рибозы у нуклеиновых кислот обусловливает наличие в системе рассредоточенного запаса свободной энергии, что придает ей свойства одномерной активной среды и создает предпосылки автоволновой самоорганизации – формирования спиральных, суперспиральных и складчатых регулярных структур [8]. Это соображение, в принципе, не тривиально и, по-видимому, впервые обсуждается в наших работах. Отмеченные вложенные структуры, в свою очередь, образуют «выделенные механические степени свободы», свойственные молекулярным машинам. Периодический характер структур молекулярных машин и принципиальная цикличность их работы явным образом предполагают наличие волновых процессов в ходе их функционирования. Реализуется давняя гипотеза «конформационных волн», теперь уже в представлениях активных сред и автоволновой самоорганизации. Ясна стала природа делокализованного ресурса энергии – гомохиральность структур всех важнейших классов биомакромолекул.

Формирование знакопеременных хиральных иерархий в макромолекулярных структурах обусловлено четкой физической причиной – стремлением системы понизить исходный уровень свободной энергии, образующийся при энергозависимом отборе гомохиральных мономеров первичных структур макромолекул из их рацемических смесей. Заметим, что в неживой природе имеется множество примеров спонтанного формирования подобных иерархий и что живая природа успешно адаптировала этот принцип [9].

В 1968 году Сайрус Левинталь сформулировал известный парадокс: «Промежуток времени, за который полипептид приходит к своему скрученному состоянию, на много порядков меньше, чем если бы полипептид просто перебирал все возможные конфигурации» [10]. Этот же термин относят и к проблеме свертывания нуклеиновых кислот. Объяснение этого парадокса связывают с предположением о существовании воронки в конфигурационном пространстве на поверхности потенциальной энергии со сложным ландшафтом, которая втягивает процесс сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию. Предполагается, что эта воронка, характеризующаяся минимумом свободной энергии, задает направление траектории фолдинга в конфигурационном пространстве макромолекулы, проходящей через цепочку локальных минимумов энергии. Однако этот образ не наполнен физическим содержанием, принцип не конкретизирован механизмом. Мы предполагаем, что обнаруженные нами знакопеременные хиральные комплементарные друг к другу последовательности структурных уровней D–L–D–L и L–D–L–D для ДНК и белков образуют ту самую «нить Ариадны», которая направляет фолдинг макромолекул по необходимой траектории в ловушку Левинталя. Термодинамические обоснования состоят в следующем. Известно, что гомохиральная молекулярная субстанция, будь то раствор аминокислот или углеводов, подвергается рацемизации, стремясь уравнять концентрации

энантиомеров, повышая до максимума энтропию системы и понижая уровень ее свободной энергии. Вместе с тем, для линейного гомохирального полимера имеется принципиальная возможность понизить свою свободную энергию не только за счет рацемизации мономеров (назовем это «горизонтальной» рацемизацией), но и за счет «вертикальной» рацемизации: за счет создания структур высшего уровня с другим знаком хиральности. В данном рассмотрении в качестве частиц в системе выступают не сами «асимметричные углероды», а «правые» и «левые» структурные единицы разного уровня организации. Таким образом, система «размазывает» свою исходную гомохиральность, понижая свободную энергию, и это сопровождается появлением у части или всех макромолекул более устойчивого (стабильного, долгоживущего, жесткого) каркаса, нежели в исходном состоянии.

В самом общем рассмотрении, пока не представляя деталей, мы можем обоснованно считать физической основой самоорганизации (фолдинга) макромолекул и их функционирования как ферментов, рецепторов, каналов, насосов и пр. внутримолекулярные волновые процессы, развивающиеся по «выделенным механическим степеням свободы», сформированным структурами с периодически изменяющимся знаком хиральности. В более широком плане, в отношении всего поля веществ и процессов взаимодействия соединений одного и разных классов биомолекул с разной хиральной основой, можно считать физическое пространство молекулярной биологии активной средой с автоволновой самоорганизацией триггерных хиральных состояний и молекулярных соответствий.

Смещение по фазе знака хиральности соответствующих структурных уровней белков и нуклеиновых кислот на половину периода, по всей вероятности, служит кодом распознавания «свой-чужой» для этих важнейших классов биомолекул. В таком случае всё поле молекулярно-биологических соответствий представляется в виде периодической таблицы - шахматной доски, где по клеткам хиральности передвигаются и взаимодействуют хиральные химические соединения.

Многие десятилетия остается не решенным принципиальный вопрос относительно того, зачем, например, ферменту нужна большая глобула, сложно иерархически организованная. Общий ответ имеется: фермент – молекулярная машина, конструкция. То, что окончательная нативная структура белка формируется исключительно в полно синтезированной цепи, свидетельствует о принципиальной роли интегрального энтропийного фактора, на наш взгляд связанного с симметриями, тогда как энтальпийный фактор срабатывает в локальных процессах структурообразования. Мы считаем, что не только фермент, но любая преобразующая вещество, энергию или информацию молекулярная машина имеет «большое тело» с хирально детерминированной иерархической структурой для двух целей: для работы всей конструкции как машины и для системного распознавания ею хиральных молекул-партнеров.

Машины.

С физической точки зрения принципиальное отличие «живого» от «неживого» состоит в том, что живые системы в качестве активных элементов используют молекулярные и макроскопические машины, преобразующие тип энергии, вещество или информацию [8]. В неживой природе машин нет, есть только преобразователи, которые не предназначены производить «полезную» работу. С физической точки зрения биологическое предназначение каждой молекулярной машины состоит в понижении симметрии системы, поддерживающей или увеличивающей её «сложность». В неживой природе спонтанные несопряженные процессы повышают уровень симметрии.

Машиной мы называем конструкцию или устройство, которое способно в циклическом режиме преобразовывать форму энергии, совершая «полезную» работу, благодаря наличию «выделенных механических, в том числе, квантово-механических) степеней свободы» (поступательных, вращательных), кинетически разделяющих работу и диссипацию. Разумеется, все молекулярные машины ввиду их малости являются изотермическими.

К элементам конструкций молекулярных машин обычно относят «жесткие» фермы, а также системы рычагов и шарниры. Это линейные элементы, каждый из которых обладает одной возможностью: передавать или не передавать силу (энергию) внутри конструкции по выделенным степеням свободы. Спираль – уникальный и простейший нелинейный элемент конструкций молекулярных машин. Спирали как жесткие конструкции способны реализовывать поступательные и вращательные степени свободы. Но для поступательного и вращательного движения в сжатой пружине существенно направление перемещения. Симметрия в передаче силы или в смещении «вперед – назад» или «вправо – влево» нарушается. Аналогией может служить дискретный вентильный элемент - конструкция «храповик – собачка». Но он не может быть реализован в живых системах буквально, тогда как спираль – может.

Для реализации цикличности как принципиальной временной характеристики «машина» предполагает обязательное наличие симметрий в конструкции, а для движения по контуру цикла в «правильном» направлении – несимметричного элемента, обладающего свойством «вентиля» или «защелки». *Любая молекулярная машина является хиральным объектом – энантиоморфом*. Сама цикличность работы машины уже предполагает однонаправленность цикла (обратимая машина работает в двух разнонаправленных циклах). Поэтому в своей структуре машина должна иметь несимметричные, вентильные – хиральные элементы. Так, циклический механизм – часы – в зеркале идут в обратном направлении (храповик и собачка – вентильный хиральный элемент.) Авторы полагают, что хиральные элементы структур биомакромолекул имеют прямое отношение к их работе как молекулярных машин. Например, у имеющих «ротор» и «статор» протонных АТФаз митохондрий и хлоропластов роторы вращаются в одном направлении в режиме насоса, а в режиме АТФ-синтетазы – в обратном.

Идея относительно хиральности (молекулярных) машин достаточно нестандартна и, по-видимому, ранее не обсуждалась в литературе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрена закономерность, касающаяся спонтанного формирования L-D-знакопеременных иерархий хиральных структур в биомакромолекулах, исходно неравновесных за счет гомохиральности первичных структур. Молекулярная биология клеток в целом составляет периодическую систему знакопеременных иерархически выстроенных хиральных структур.

К машинам относят устройства (конструкции), способные в циклическом режиме преобразовывать форму энергии, совершая «полезную» работу, благодаря наличию «выделенных механических, в том числе, квантово-механических, степеней свободы», кинетически разделяющих работу и диссипацию. Вследствие цикличности всякая молекулярная машина является хиральным объектом. Особенностью молекулярных машин является кооперативное участие вторичных, третичных (при наличии надмолекулярных комплексов - четвертичных) макромолекулярных структур в их работе, что обеспечивается иерархическим сопряжением соответствующих «хиральных» степеней свободы.

Актуальным шагом в дальнейшем развитии обсуждаемой проблемы представляется теоретический анализ функционирования «энтальпийных» и «энтропийных» молекулярных машин и выработка подходов к пониманию физических механизмов участия хиральных перестроек в процессах фолдинга и непосредственной роли «выделенных механических степеней свободы» в механохимии биомакромолекул и ферментативного катализа (см. [5]).

Авторы благодарят своих друзей и коллег Л.В. Яковенко и А.Э. Сидорову за полезные обсуждения материалов статьи.

Исследование выполнено при частичной поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-50-00029).

Список литературы / References:

1. Dill K.A., MacCallum J.L. The Protein-Folding Problem, 50 Years On. *Science*, 2012, vol. 338, p. 1042.

2. Финкельштейн А.В. 50+ лет самоорганизации белков. *Успехи биологической химии*, 2018, т. 58, с. 7-40. [Finkelshtein A.V. 50+ years of protein self-organisation. *Uspekhi biologicheskoj himii*, 2018, vol. 58, pp. 7-40. (In Russ.)]

3. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. Релаксационный фолдинг и принцип минимума скорости диссипации энергии для конформационных движений в вязкой среде. *Биофизика*, 2016, т. 61, вып. 4, с. 629-637. [Shaitan K.V., Lozhnikov M.A., Kobelkov G.M. Relaxation Folding and the Principle of the Minimum Rate of Energy Dissipation for Conformational Motions in a Viscous Medium. *Biofizika*, 2016, vol. 61, iss. 4, pp. 629-637. (In Russ.)]

4. Твердислов В.А. Хиральность как первичный переключатель иерархических уровней в молекулярно-биологических системах. *Биофизика*, 2013, том 58, вып. 1, с. 159-164. [Tverdislov V.A. Chirality as a Primary Switch of Hierarchical Levels in Molecular Biological Systems. *Biofizika*, 2013, vol. 58, iss. 1, pp. 159-164. (In Russ.)]

5. Блюменфельд Л.А. *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики.* М.: Эдиториал УРСС, 2002. [Bluemenfeld L.A. *Solved and unsolved problems of biological physics.* Moscow: Editorial URSS, 2002. (In Russ.)]

6. Чернавский Д.С. Проблема происхождения жизни и мышления с точки зрения современной физики. *УФН*, 2000, т. 170, с. 157-183. [Chernavskii D.S. The origin of life and thinking from the viewpoint of modern physics. *Phys. Usp.*, 2000, vol. 170, pp.157-183. (In Russ.)]

7. Kaku M. *Introduction to superstrings and M-Theory.* Springer-Verlag New York, Inc., 1999.

8. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам. *Известия РАН. Серия физическая*, 2015, т. 79, с. 1728-1732. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Ilchenko S.A. From Autowave Mechanisms of Self-Assembly to Molecular Machines. *Izvestiya RAN. Seriya fizicheskaya*, 2015, vol 79, pp. 1728-1732. (In Russ.)]

9. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А., Жулябина О.А., Яковенко Л.В. Периодическая система хиральных структур в молекулярной биологии. *Биофизика*, 2017, т. 62, с. 421-434. [Tverdislov V.A., Malyshko E.V., Il'chenko S.A., Zhulyabina O.A., Yakovenko L.V. A Periodic System of Chiral Structures in Molecular Biology. *Biofizika*, 2017, vol. 62, pp. 421-434. (In Russ.)]

10. Levinthal C. in *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proc. meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois* (Eds J T P DeBrunner, E Munck) (University of Illinois, 1969), p. 22.

MOLECULAR MACHINES AS HIERARCHICAL CHIRAL STRUCTURES

Malyshko E.V., Tverdislov V.A.
Lomonosov Moscow State University
Leninskiye Gory St., 1, k.2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: katyamalyshko@mail.ru, tverdislov@mail.ru

Abstract. Molecular machines are the most important physical attribute of living systems, they are hierarchically organized structures. We substantiate the concept according to which the chiral duality of carbon compounds is the physical symmetry basis of structure formation in molecular biology, and the homochirality of amino acids, ribose and deoxyribose is a resource of free energy and a tool for stratification of intramolecular and supramolecular structural levels. The causes and peculiarities of the chirality sign alternation for the intramolecular structural levels of L-D-L-D for proteins and D-L-D-L for DNA are discussed. Folding in macromolecules is considered as an autowave process of self-organization in active media with varying dimension. It is noted that in the intermolecular interactions in these biomacromolecules there is a domination of the sign of chirality of the intramolecular structure of the higher level that directly participates in interactions. The introduction of a common symmetry factor - chirality - into consideration of the spatial organization of macromolecules allows to consider the physical nature of hierarchies as well as the space of transformations and interactions of substances in metabolism and biosynthesis as a periodic system of chiral structures. We propose and substantiate that the alternating chiral hierarchy of the conjugate levels of macromolecular structures in proteins and nucleic acids has a general biological significance: it causes their discreteness, serves as a folding tool, the structural basis of the "allocated mechanical" degrees of freedom in the designs of macromolecular machines, and also one of the mechanisms of the block/saltatory progress of the evolutionary process.

Key words: *chirality, structural levels, helices, superhelices, folding, autowave self-organization, molecular machines.*

БИОФИЗИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ САМООРГАНИЗАЦИИ БИОСФЕРЫ КАК ИЕРАРХИИ АКТИВНЫХ СРЕД

Сидорова А.Э., Твердислов В.А.
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: sky314bone@mail.ru
Поступила в редакцию: 09.07.2018.

Аннотация. Рассмотрена биофизическая модель эволюции биосферы на базе представлений о самоорганизации в иерархически сопряженных активных средах. Данный системный подход позволяет по-новому рассмотреть идеи бифуркационного развития биосферы на всех иерархических уровнях биологической эволюции. В модели движущей силой эволюции биосферы служит система связей в иерархия распределенных активных сред, составленных мозаикой биоценозов. Активная среда создает фронтальное «давление естественного отбора». Пассивный фильтр естественного отбора позволяет выйти ветвям эволюции на устойчивую траекторию развития и закрепиться на ней. В отличие от классического филогенетического древа, отражающего принцип вертикальной эволюции биосферы, в данном подходе биосфера – единый организм, эволюционирующий по законам, определяемым отбором, переносом генов, конвергенцией и дивергенцией – механизмами эволюции. Эта трехмерная сеть прямых и обратных связей позволяет нам рассматривать эволюционирующую биосферу как иерархию активных сред.
Ключевые слова: *иерархия активных сред, автоволны, биосфера, эволюция.*

Иерархичность организации и дискретность элементов системы являются принципиально важными условиями биологической эволюции. Дискретность обеспечивает индивидуальные особенности горизонтального и вертикального взаимодействия, определяющие устойчивое развитие популяций, иерархичность — системную направленность интегрального процесса эволюции. Дискретность делает возможным естественный отбор, микроэволюцию, иерархичность позволяет сопрягать разномасштабные процессы в пространстве и времени, выделяя общее направление макроэволюции. Два этих качества, имеющие в своей основе физико-химические закономерности и пришедшие в живую природу из неживой в процессах биопоэза, составляют системную основу эволюционного единства структуры и функций в живых системах.

Распределенный ресурс (энергия, вещество, информация) системы утилизируется связанными между собой «диффузией» нелинейными локальными трансформаторами. Для физико-химической системы – это распространяющаяся в пространстве фаза процесса, для биосферы - это и изменение ареала, и изменение генома. Активная среда, будучи нелинейной диссипативной системой, «способна» создать начинающуюся с флуктуаций упорядоченную пространственно-временную структуру с пониженным, относительно исходного, рангом симметрии. Тогда как внешние воздействия, вызывающие различные явления в стационарной линейной макроскопической системе, не могут обладать более высокой симметрией, чем порождаемый ими процесс. В ходе автоволновой самоорганизации активная среда способна сопрягать процессы, соизмеримые в масштабах двумерного горизонтального пространства и времени (коггерентность) [1, 2]. Иерархичность биологических систем предопределяет возможность сопряжения процессов разного масштаба в пространстве и времени. Хиральность структур смежных иерархических уровней делает возможной их устойчивую стратификацию [1, 2].

В отличие от классического филогенетического древа, отражающего принцип вертикальной эволюции биосферы, в нашем представлении биосфера – единая живая система, эволюционирующая по законам, определяемым отбором, переносом генов, конвергенцией и дивергенцией – механизмами эволюции. Эта трехмерная сеть прямых и обратных, положительных и отрицательных связей в распределенной трехмерной системе позволяет нам рассматривать эволюционирующую биосферу как иерархию активных сред (рис. 1).

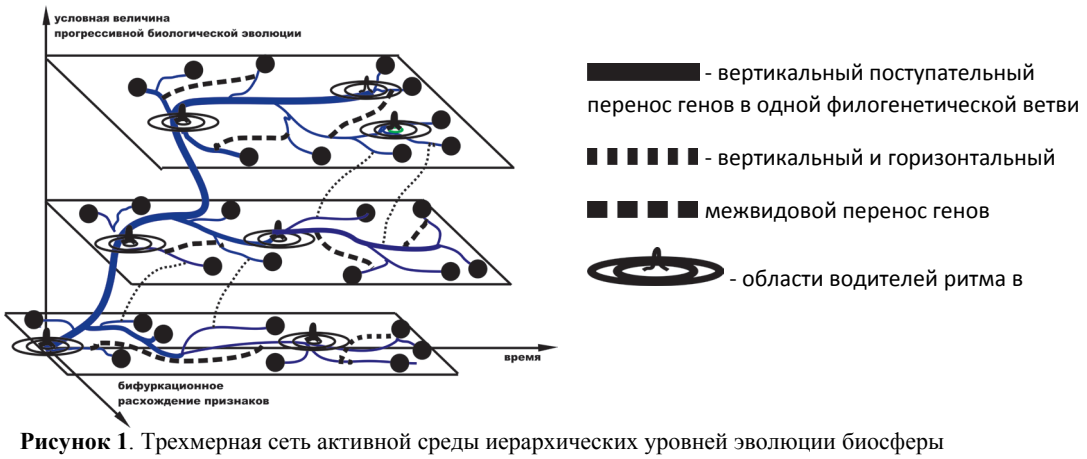


Рисунок 1. Трехмерная сеть активной среды иерархических уровней эволюции биосферы

Эволюционный процесс можно уподобить потоку, который вызывается или всасывающим или нагнетающим насосом, а естественный отбор – это «фильтр» в движущемся потоке. Отбор может только определить траектории развития отдельных популяций и видов на данный момент времени и в данном биоценозе. Движущей силой эволюции биосферы - «нагнетающим насосом» - служит иерархия распределенных активных сред, составленных мозаикой биоценозов. С физической точки зрения мы имеем дело с «машинами» разного уровня организации. В отличие от пассивной среды, в которой возможны малые флуктуации, активная среда способна формировать регулярные в пространстве и времени гигантские флуктуации, подобно протуберанцам на Солнце. В отличие от «малых» флуктуаций «гигантские флуктуации» обретают структуру. В целом, активная среда создает фронтальное «давление естественного отбора». С этими гигантскими флуктуациями как раз и «работает» внешний пассивный фильтр естественного отбора, позволяющий выйти данной ветви эволюции на устойчивую траекторию развития и закрепиться на ней. Среда с локальными неоднородностями может выступать в роли эффективного однонаправленного автоволнового фильтра [1, 2].

Отбор способствует формированию регулярной и стабильной иерархической структуры, а также устойчивой системы горизонтальных взаимодействий посредством контроля наследственного закрепления приобретенных признаков. Генетический дрейф «работает» в пространстве и времени и направлен на горизонтальное перераспределение признаков между популяциями, а вертикальный перенос генов на закрепление генетического материала в поколениях. «Точки приложения» дивергенции и конвергенции – точки бифуркации. При этом наличие в системе «поддерживающих» мутаций служит основой автокаталитических режимов, характерных для автоволновой самоорганизации в активных средах. А дивергенция и конвергенция играют роль направляющих векторов в пространстве и времени в точках бифуркации. Устойчивость эволюционного процесса биосферы определяется диалектическим единством дивергенции и конвергенции в процессе развития эволюционирующих систем и закрепляется на уровне вида.

Естественный отбор можно сравнить с явлением перколяции в физико-химии – протеканием среды. Перколяции могут наблюдаться в решетках или других конструкциях, в том числе непрерывных, состоящих из большого числа подобных элементов или непрерывных областей, если такие распределенные системы находятся, подобно триггеру, в одном из двух устойчивых состояний. Иными словами, перколяция - это момент появления такого состояния системы, при котором образуется хотя бы один непрерывный путь через соседние проводящие узлы между противоположными краями системы. Система перколяций (как и естественный отбор) – распределенная пассивная среда, тогда как эволюционирующая биосфера – распределенная активная среда. В целом, активная среда создает фронтальное «давление естественного отбора» через гигантские флуктуации, с которыми как раз и «работает» внешний пассивный фильтр естественного отбора, позволяющий выйти данной ветви эволюции на устойчивую траекторию развития и закрепиться на ней. Поэтому движущей силой эволюции мы называем иерархию распределенных активных сред, составленных мозаикой биоценозов [1, 2].

Элементарной единицей эволюционного отбора является популяция, единицей устойчивого эволюционирования – биоценоз. Поэтому любой из механизмов регулирования численности и плотности популяций, «работающих» в реакторе микроэволюции, может инициировать формирование водителей ритма и вызвать автоколебательные и автоволновые процессы. В ряде случаев совпадающими по фазе оказываются циклические колебания численности не только разных популяций одного вида, но и разных видов, обитающих в общей экосистеме. Повышение численности и плотности популяции, изменение факторов среды «вынуждает» популяцию к фенотипическим и генотипическим изменениям и способствует синхронизации циклов – возникновению когерентных состояний. Снижение плотности и численности популяции снижает ее ресурс как активной среды, и в этом случае, даже при возникновении водителей ритма, распространение автоволн затруднительно, причем даже в однородной среде [1]. В качестве узлов перколяционной решетки отбора принимаем эффективный размер популяции. порог протекания [3] связан с Nэф и количеством закрепившихся на популяционном уровне мутаций. Вероятность PN(b)(x) для конечного числа узлов $N_{эф}$. отлична от нуля при $0<x< x_c$ и $N \rightarrow N_{эф}$. При некотором минимальном критическом значении доли целых узлов ($N_{эф}$) вероятность существования соединяющего кластера обращается в нуль – это порог протекания. Т.е. порог протекания $x_c = N_{эф}/ N$.

Процесс биологической эволюции связан с усложнение организмов и, соответственно, с размерами функциональной части генома (МГР) - «программой» развития и функционирования организма. Чем больше размер геном, тем больше вероятность обеспечения большего число потенциальных «ниш» для новых генов [4]. В эволюционной линии от прокариот к млекопитающим отчетливо прослеживается положительная корреляция между МГР и сложностью организма [5, 6]. Принято считать, что к основным механизмам увеличения размера МГР относятся: дупликация фрагментов ДНК, формирование новых функциональных участков ДНК (кодирующих и регуляторных) на основе комбинаторного принципа [5], с закономерностями эволюции генных сетей [7, 8], МГЭ [8, 9]. Безусловно, все эти механизмы чрезвычайно важны, но все они в той или иной мере связаны с мутационными процессами – двигателем биологической эволюции. Мы полагаем, что основным механизмом формирования МГР служат мутации – активатор процесса автоволновой самоорганизации, способствующий формированию гигантских флуктуаций в ходе видообразования, а основным ингибитором – системы репарации, обеспечивающие баланс между стабильностью информации в ДНК и ее эволюционной изменчивостью. И чем сложнее клетка, тем большее количество структурных и регуляторных генов участвуют в процессах репарации ДНК. При этом системы репарации (прямая, эксцизионная, пострепликативная, рекомбинационная) отличаются используемыми субстратами, ферментами и механизмами устранения

поврежденных звеньев. Размеры МРГ в пределах большой группы организмов существенно отличаются. Но на каждом этапе усложнения существует свой максимальный размер генома и МГР [4, 6]. При этом увеличение размера МГР как информационная составляющая биологической эволюции способствовало формированию дополнительных степеней свободы для генетических преобразований и, следовательно, росту биоразнообразия.

В [10] геном рассматривается как гиперцикл. Согласно теории гиперциклов Дарвина-Эйгена, гиперциклы – это способ объединения самовоспроизводящихся макромолекул в замкнутые автокаталитические химические циклы, т.е. естественный отбор на уровне молекул. Порог Эйгена – предел, ограничивающий достоверность репликации: если произведение частоты мутаций и информационной емкости системы (размер генома) ниже порога Эйгена – стабильное наследование, а если выше порога - мутационная катастрофа и вымирание. При этом рост размеров генома связан с увеличением сложности организмов в ходе эволюции, т.е. с минимальным размером генома. С одной стороны, увеличение размера генома связано с увеличением с ростом его информационной емкости (в пределах таксонов рост генома может и не выявляться, как, например, в эволюции птиц и прокариот преобладающей тенденцией, вероятно, было уменьшение размера генома), и, с другой стороны, способствовало росту биоразнообразия, предоставив дополнительные степени свободы для генетических комбинаций. Известно, что системы с большим количеством взаимодействующих элементов, благодаря накоплению малых флуктуаций и возникновению гигантской флуктуации, переходят в новое качественное состояние через критические точки – состояния самоорганизованной критичности, в которых система приобретает масштабную инвариантность [11]. В отличие от модели Бака и Снеппена (BS-модель), в основе которой численность видов, мы полагаем, что в модели эволюции биосферы на каждой ступени иерархической сложности организмов в качестве предела этой сложности может рассматриваться МРГ. В этом случае в бифуркационной модели активной среды существуют два состояния устойчивости и одно соответствует состоянию самоорганизованной критичности в процессе видообразования - размер МГР на основных этапах эволюции больших групп организмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные представления отражают не только нелинейность биологических процессов в биофизической модели самоорганизации биосферы как иерархии активных сред, но, главное, формулируют подход к пониманию природы распределенной движущей силы эволюционного процесса как кооперативного пространственно-временного явления. В основе своей физико-химического, а по проявлениям и функциям – биологического. Построенная на представлениях о бифуркациях идея биологической эволюции отражает единство двух противоположностей – прогресса и необратимости в эволюции. С физической точки зрения мы имеем дело с кинетической необратимостью. Термодинамическая необратимость проявляется в макроэволюции, а кинетическая – в микроэволюции.

Список литературы / References:

1. Сидорова А.Э., Твердислов В.А. Самоорганизация в иерархии активных сред как движущая сила эволюции биосферы. *ВМУ. Серия 3. Физика. Астрономия*, 2012, т. 68, № 2, с. 65-69. [Sidorova A.E., Tverdislov V.A. Self-Organization as the Driving Force for the Evolution of the Biosphere. *Moscow University Physics Bulletin*, 2012, vol. 68, no. 5, p. 405-410. (In Russ.)]

2. Твердислов В.А., Сидорова А.Э., Яковенко Л.В. *Биофизическая экология*. Монография. М.: УРСС, 2012, 544 с. [Tverdislov V.A., Sidorova A.E., Yakovenko L.V. *Biophysical ecology*. Monograph. M.: URSS, 2012, 544 p. (In Russ.)]

3. Broadbent S.R., Hammerslae J.M. Percolation process. 1. Crystals and mazes. *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, 1953, vol. 53, pp. 629-641.

4. Sharov A.A. Genome increase as a clock for the origin and evolution of life. *Biology Direct*, 2006, vol. 1, p. 17.

5. Patthy L. Genome evolution and the evolution of exon shuffling – a review. *Gene*, 1999, vol. 238, no. 1, pp. 103-114.

6. Марков А.В., Анисимов В.А., Коротаев А.В. Взаимосвязь размера генома и сложности организма в эволюционном ряду от прокариот к млекопитающим. *Палеонтологический журнал*, 2010, № 4, с. 3-14. [Markov A.V., Anisimov V.A., Korotaev A.V. The relationship between the size of the genome and the complexity of the organism in the evolutionary series from prokaryotes to mammals. *Paleontological Journal*, 2010, no. 4, pp. 3-14. (In Russ.)]

7. Колчанов Н.А., Ананько Е.А., Колпаков Ф.А. [и др.] Генные сети. *Мол. биол.*, 2000, т. 34, с. 533-544. [Kolchanov N.A., Ananko E.A., Kolpakov F.A. Gene networks. *Mol. Biol.*, 2000, vol. 34, pp. 533-544. (In Russ.)]

8. Mikkelsen T.S., Wakefield M.J., Aken B. [et al.] Genome of the marsupial Monodelphis domestica reveals innovation in noncoding sequences. *Nature*, 2007, vol. 447, no. 7141, pp. 167-177.

9. Miller W.J., McDonald J.F., Nouaud D., Anxolabe'hère D. Molecular domestication – more than a sporadic episode in evolution. *Genetica*, 1999, vol. 107, pp. 197-207.

10. Eigen M., Schuster P. The hypercycle. A principle of natural self organization. Part A: emergence of the hypercycle. *Naturwiss*, 1977, vol. 64, no. 11, pp. 541-565.

11. Per Buck. *How nature works: the theory of self-organized criticality*. Moscow: URSS: Librocom, 2013, 269 p.

BIOPHYSICAL MODEL OF SELF-ORGANIZATION OF THE BIOSPHERE AS THE HIERARCHY OF ACTIVE MEDIA

Sidorova A.E., Tverdislov V.A.
Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory St., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: syoanya@yandex.ru

Abstract. A biophysical model of the evolution of the biosphere is considered on the basis of ideas about self-organization in hierarchically conjugate active media. This systematic approach allows us to re-examine the ideas of the bifurcation development of the biosphere at all hierarchical levels of biological evolution. In the model, the driving force behind the evolution of the biosphere is the hierarchy of distributed active media composed of a mosaic of biocenoses. The active medium creates a frontal "pressure of natural selection". A passive filter of natural selection allows branches of evolution to escape to a stable trajectory of development and gain a foothold on it. Unlike the classical phylogenetic tree, which reflects the principle of the vertical evolution of the biosphere, in this approach the biosphere is a single organism evolving according to the laws determined by selection, gene transfer, convergence and divergence – the mechanisms of evolution. This three-dimensional network of direct and feedback links allows us to consider the evolving biosphere as a hierarchy of active media.
Key words: *hierarchy of active media, autowaves, biosphere, evolution.*

ПРОДУКТИВНОСТЬ И КПД ФОТОБИОСИНТЕЗА *SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS* ПРИ РАЗЛИЧНОМ СПЕКТРАЛЬНОМ СОСТАВЕ СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Гаврилов П.Е.[1], Костылев А.А.[1], Лелеков А.С.[2], Малахов А.С.[3]

[1] Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: havrilovpyotr@gmail.com

[2] Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov @yandex.ru

[3] Национальный исследовательский Томский политехнический университет

пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: mac89@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Проведено исследование роста накопительной культуры *Spirulina platensis* при различном спектральном составе светодиодного излучения в плоскопараллельных фотобиореакторах. В опытных вариантах использовали мощные (50 Вт) светодиоды теплого, холодного света, а также фитосветодиод. В контрольном варианте источником света являлась световая решётка из 10 люминесцентных ламп TDM Electric 18 Вт. Показано, что максимальная продуктивность *S. platensis* не зависит от спектра излучения светодиода и составляет 0,37 г СВ·л$^{-1}$·сут$^{-1}$. При этом в контрольном варианте максимальная продуктивность была на 30 % ниже. Максимальная значение биомассы *S. platensis* достигнуто при использовании мощного светодиода холодного света. На линейной фазе роста рассчитана эффективность преобразования световой энергии (КПД фотобиосинтеза): для фитосветодиода данная величина была минимальна и составила 1,67 %; для теплого светодиода – максимальна и равнялась 6,47 %.

***Ключевые слова**: фотоавтотрофы, накопительная культура, максимальная продуктивность, фотобиосинтез, мощный светодиод.*

Культура микроводорослей используется в качестве модельного объекта при исследовании влияния абиотических факторов среды на скорость роста и биосинтез низших фотоавтотрофов. Одним из наиболее исследованных видов является цианобактерия *Spirulina (Arthrospira) platensis*, которая также выращивается в промышленных масштабах как источник белка, витаминов и др. биологически ценных веществ. Все внешние факторы, влияющие на скорость роста *S. platensis*, можно разделить на две группы: 1. Световое обеспечение; 2. Минеральное обеспечение биогенными элементами. Свет является основным фактором среды, который определяет скорость роста культуры *S. platensis*. Помимо скорости роста, от световых условий, в которых находятся клетки, зависит их биохимический состав. Поэтому при исследовании фотобиосинтеза культур микроводорослей важно знать не только общее количество энергии ФАР, приходящей на рабочую поверхность культиватора, но и её спектральный состав. В литературе имеются сведения, что при избытке красного света в клетках *S. platensis* происходит перераспределение синтеза компонентов комплексов фотосистем, при преобладании жёлтого света происходит увеличение скорости синтеза фикоцианина [1-3].

Среди современных источников искусственного освещения для лабораторных и промышленных задач по выращиванию микроводорослей на первое место выходят светодиоды. Они обладают довольно высоким КПД (по сравнению с другими источниками света) передачи электрической энергии в световую. Кроме того, использование комбинации светодиодов позволяет получить заданный спектральный состав света, что имеет значение при выращивании фотоавтотрофных организмов. Последнее время получили распространение мощные светодиоды, которые, по сути, являются комбинацией нескольких узкополосных светодиодов. Достоинством мощных светодиодов можно отнести не высокую стоимость, разнообразие спектров излучения, для культивирования микроводорослей или цианобактерий в лабораторных условиях достаточно одного светодиода, что значительно упрощает и удешевляет конструкцию световой решетки, которая обычно собирается из набора люминесцентных ламп.

Целью работы являлось определение максимальной скорости роста и эффективности преобразования энергии накопительной культуры *S. platensis* при её выращивании на различных источниках светодиодного излучения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была выбрана *Spirulina (Arthrospira) platensis*, полученная из коллекции Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН, г. Севастополь. *S. platensis* выращивали в унифицированной лабораторной установке [4] на питательной среде Заррук, фотобиореактор плоскопараллельного типа толщиной 2 см, площадь рабочей поверхности 0,06 м^2. Температура поддерживалась на уровне 24±1 °С. В различных опытных вариантах в качестве источника освещения использовали мощный (50 Вт, напряжение питания 12 В) светодиод теплого света, мощный светодиод холодного света, фитосветодиод. В качестве контрольного варианта использовали световую решетку из десяти люминесцентных ламп TDM

Electric 18 Вт. Освещённость рабочей поверхности фотобиореактора во всех вариантах была одинаковой и составляла 10 клк.

В эксперименте проводили измерение температуры, оптической плотности культуры микроводорослей, а также сухой биомассы. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в фотобиореакторе, абсолютная погрешность измерений составляла 0,5°С. Освещённость регистрировали люксметром Ю-116. Отбор проб для определения оптической плотности проводили из разных точек внутри фотобиореактора: отбирали по 5 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 30 мл. В средней пробе после перемешивания определяли коэффициент пропускания. Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. При пересчёте единиц оптической плотности на сухую биомассу (СВ) использовали эмпирический коэффициент 0,88. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (от 30 до 70 % пропускания), проба разбавлялась дистиллированной водой. Для определения спектра излучения источников света использовали спектроколориметр ТКА-ВД/02 и программное обеспечение "Спектрофотометр".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Накопительная кривая является основной характеристикой роста культуры микроводорослей в тех или иных условиях. По форме накопительной кривой можно определить факторы, ограничивающие величину продуктивности. Обычно на накопительной кривой можно выделить несколько фаз роста, каждая из которых характеризуется некоторым видоспецифическим параметром. При переходе от одной фазы к другой происходит смена лимитирующего фактора, при этом может наблюдаться резкое изменение угла наклона кривой к оси абсцисс.

На рисунке 1а представлена накопительная кривая роста культуры *S. platensis* в контрольном варианте (спектр излучения люминесцентных ламп – рис. 1б).

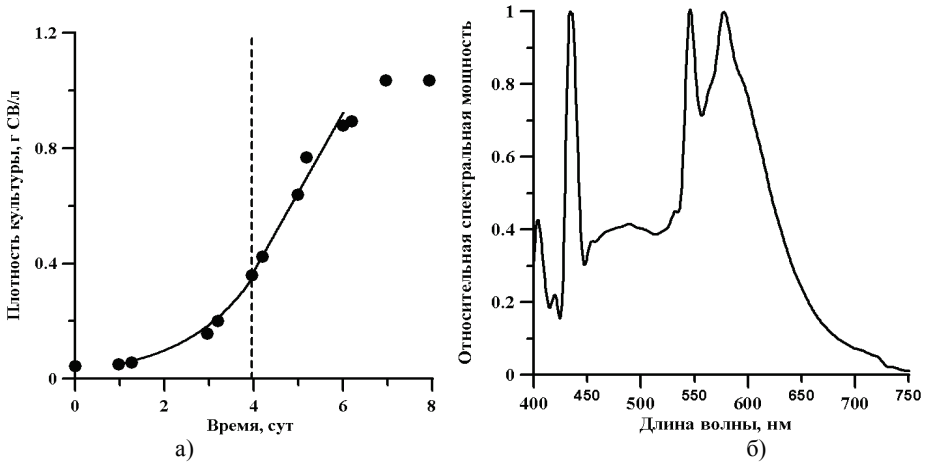
Анализируя накопительную кривую на рис. 1а, можно отметить наличие экспоненциальной, линейной, фазы замедления роста и стационарной фазы. Определим кинетические параметры рост культуры *S. platensis*. Экспоненциальная фаза характеризуется постоянством максимальной удельной скорости роста, которая определяется внешними световыми условиями и внутренней организацией "узкого места" переноса энергии в клетке. Данная фаза описывается экспоненциальной функцией, аппроксимация экспериментальных данных которой представлена на рисунке 1а. Уравнение роста плотности культуры *S. platensis* для экспоненциальной фазы можно записать в виде:

$$B = 0,051 \cdot e^{(0,64 \cdot (t-0,97))},$$

где максимальная удельная скорость роста $\mu_m = 0,64$ сут$^{-1}$.

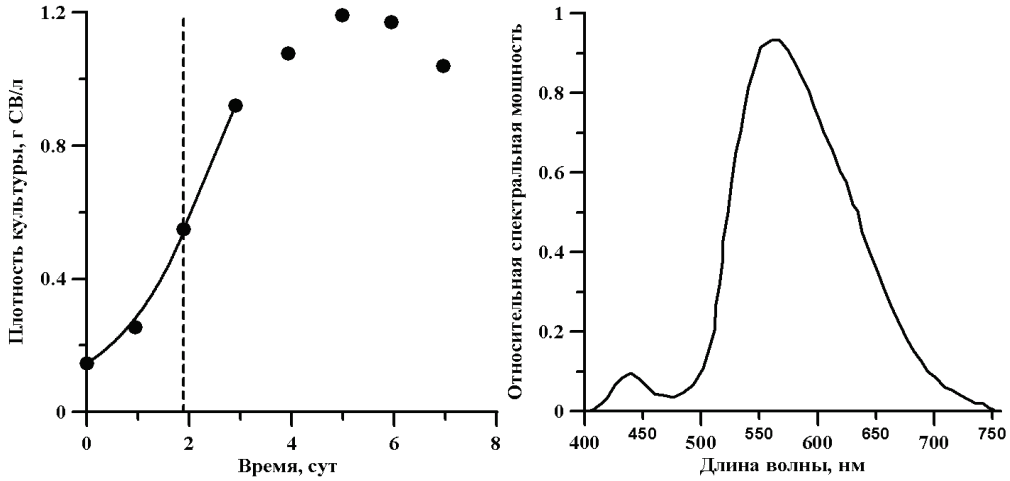
Линейная фаза роста характеризуется постоянством максимальной продуктивности культуры P_m, которая в свою очередь определяется величиной светового потока на ключевой фермент [5]. Аппроксимация линейной фазы роста позволила определить величину P_m, которая составила 0,27 г СВ·л$^{-1}$·сут$^{-1}$:

$$B = 0,36 + 0,27 \cdot (t - 3,96).$$



а) б)

Рисунок 1. Накопительная кривая роста культуры *S. platensis* (а) при её выращивании на люминесцентных лампах TDM Electric 18 Вт. Линия – аппроксимация экспоненциальной и линейной фаз роста. Значения коэффициентов в тексте. (б) – спектр излучения люминесцентных ламп TDM Electric 18 Вт



а) б)

Рисунок 2. Накопительная кривая роста культуры *S. platensis* (а) при её выращивании на мощном светодиоде теплого света. Линия – аппроксимация экспоненциальной и линейной фаз роста. Значения коэффициентов в тексте. (б) – спектр излучения мощного светодиода теплого света

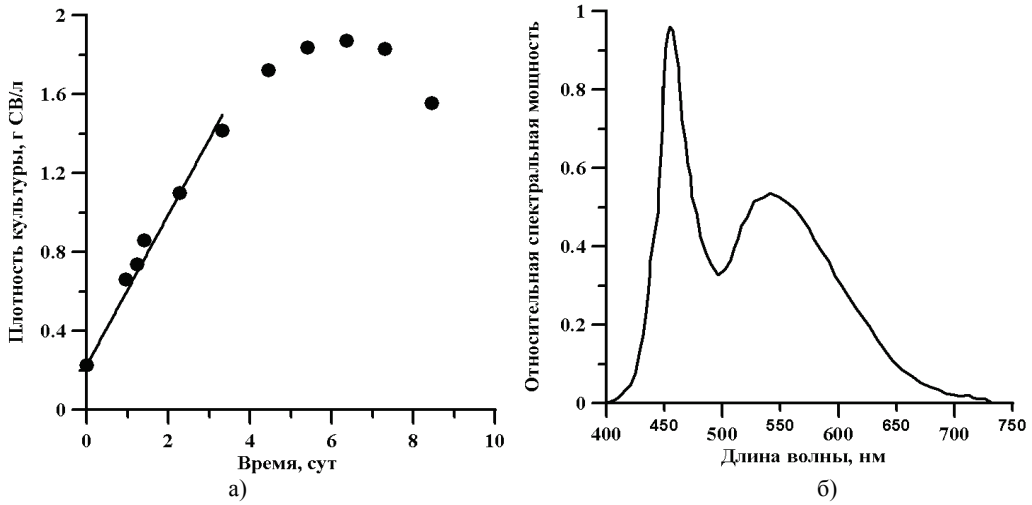
Аналогичные расчёты были проведены для всех опытных вариантов (рис. 2а, 3а, 4а), значения максимальной удельной скорости роста и максимальной продуктивности, а также максимальной плотности культуры в стационарной фазе внесены в таблицу 1.

Анализируя значения кинетических коэффициентов роста, представленных в таблице 1, можно сделать вывод, что максимальная продуктивность культуры *S. platensis* практически не зависит от спектра светодиодного освещения, однако для люминесцентных ламп продуктивность ниже почти на 30 %.

Величина максимальной плотности спирулины в нашем эксперименте напрямую зависела от спектра падающего на рабочую поверхность фотобиореактора света. Известно, что спектральный состав света определяет пигментный и биохимический состав клеток микроводорослей [1], следовательно, для достижения максимальной плотности культуры необходимо в качестве источника световой энергии использовать мощный светодиод холодного света, спектр излучения которого представлен на рисунке 3б.

Основной энергетической характеристикой роста культуры микроводорослей является эффективность преобразования световой энергии в энергию химических связей внутри клетки или КПД фотобиосинтеза. По определению, КПД фотобиосинтеза есть отношение двух величин: запасённой (E_x) и поглощённой световой энергии (E_n) [6]:

$$\eta = \frac{E_x}{E_n} \cdot 100\% .$$



а) б)

Рисунок 3. Накопительная кривая роста культуры *S. platensis* (а) при её выращивании на мощном светодиоде холодного света. Линия – аппроксимация экспоненциальной и линейной фаз роста. Значения коэффициентов в тексте. (б) – спектр излучения мощного светодиода холодного света

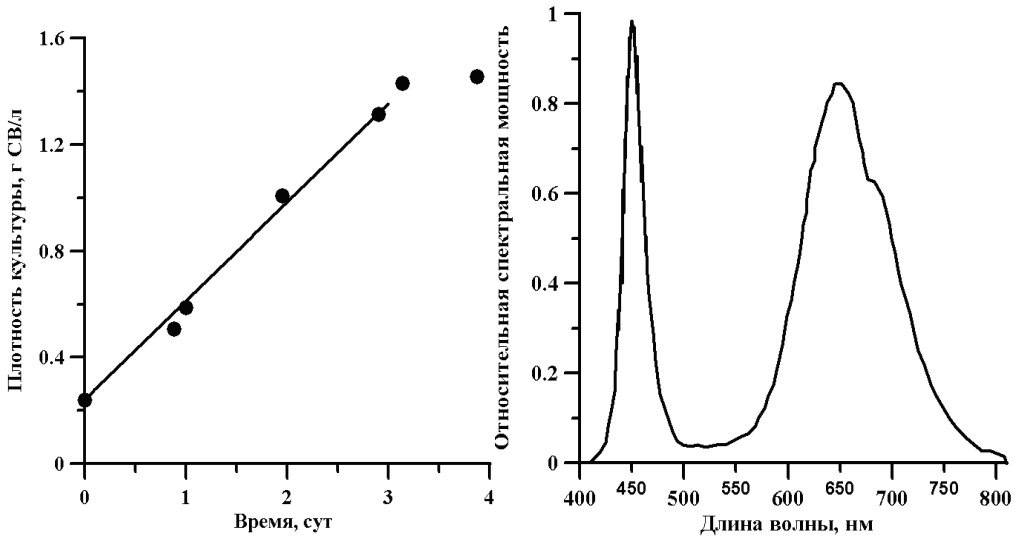


Рисунок 4. Накопительная кривая роста культуры *S. platensis* (а) при её выращивании на мощном фитосветодиоде. Линия – аппроксимация линейной фазы роста. Значения коэффициентов в тексте. (б) – спектр излучения мощного фитосветодиода

Поглощённая энергия зависит от мощности падающей на рабочую поверхность фотобиореактора энергии (E_0), площади (S), времени (t) и коэффициента поглощения энергии клетками микроводорослей (α):

$$E_n = E_0 \cdot S \cdot t \cdot \alpha.$$

Очевидно, что E_0 определяется спектральной характеристикой источника излучения и для разных вариантов нашего эксперимента будет отличаться. Величина α определяется спектром поглощения непосредственно культуры, однако если рассмотреть линейный участок роста, то для таких высоких оптических плотностей коэффициент поглощения энергии близок к единице: $\alpha \approx 1$.

Величина E_x определяется произведением прироста биомассы и её калорийностью R, т.е.

$$E_x = R \cdot P \cdot V,$$

где P – продуктивность или абсолютная скорость роста, г СВ/(л·сут); V = 1 л – рабочий объём культуры.

Окончательно выражение для определения КПД фотобиосинтеза культуры *S. platensis* можно представить в виде:

$$\eta = \frac{R \cdot P}{E_0 \cdot S \cdot t}.$$

Для определения количества поглощенной энергии переведём фотометрические единицы освещённости в единицы энергетического количества. Для этого используем соотношение [6]:

$$E_0 = 1,464 \cdot 10^{-3} \cdot N \cdot E_v,$$

где E_o – облучённость, Вт/м^2; E_v – освещённость поверхности, лк; N – отношение величин полной и определяемой люксметром световой энергии.

Таблица 1. Значения максимальной удельной скорости роста, максимальной продуктивности и максимальной плотности культуры *S. platensis* для различных источников освещения

Тип источника освещения	Максимальная удельная скорость роста, сут$^{-1}$	Максимальная продуктивность, г СВ/(л·сут)	Максимальная плотность культуры, г СВ/л
Люминесцентные лампы	0,64	0,27	1,04
Теплый светодиод	0,69	0,37	1,19
Холодный светодиод	–	0,38	1,87
Фитосветодиод	–	0,37	1,46

Таблица 2. Значения отношение величин полной и определяемой люксметром световой энергии, облучённость, мощность энергии ФАР, приходящееся на рабочую поверхность фотобиореактора и КПД фотобиосинтеза культуры *S. platensis* для различных источников освещения

Тип источника освещения	N	E, Вт/м^2	E_0, Вт	КПД, %
Люминесцентные лампы	2.03	29,65	1,78	3,67
Теплый светодиод	1.59	23,23	1,39	6,47
Холодный светодиод	2.16	31,68	1,9	4,86
Фитосветодиод	6.12	89,57	5,37	1,67

Средняя калорийность 1 г биомассы *S. platensis*, как и многих других видов микроводорослей, составляет около 5 ккал или 20,86 кДж [6]. Отметим, что калорийность биомассы определяется её биохимическим составом (соотношением белков, жиров и углеводов), который может варьировать в широких пределах и определяется условиями культивирования. При дальнейших расчётах будем использовать указанное среднее значение калорийности.

Таким образом, мы можем рассчитать величину КПД фотобиосинтеза для различных источников освещения (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что КПД фотобиосинтеза оказался максимален для мощного светодиода теплого света. Анализируя его спектр (рис. 2б) можно сделать вывод, что большая часть энергии приходится в зелёную и желтую область ФАР, попадая на реакционные центры фотосистем только через пигменты светособирающего комплекса. В случае облучения культуры фитосветодиодом (рис. 4б), мы имеем дело с противоположным вариантом: практически вся энергия приходится на хлорофилл a, причём общее количество которой почти в 4 раза больше, чем у теплого светодиода. Это приводит к фотоокислению пигментов реакционных центров, и соответствующему снижению КПД. Полученные результаты следует рассматривать как оценочные, которые требуют дальнейшего уточнения путём учёта коэффициента поглощения энергии (α) культурой *S. platensis*.

ВЫВОДЫ

1. Величина максимальной продуктивности культуры *S. platensis* при её выращивании на различных 50 Вт светодиодах одинаковая и не зависит от их спектра излучения. Максимальное значение биомассы достигнуто при использовании мощного светодиода холодного света.

2. Эффективность преобразования энергии (КПД фотобиосинтеза) максимальна при культивировании *S. platensis* с использованием мощного светодиода теплого света.

Работа выполнена в рамках госзадания по НИР «Разработка научных основ решения гидробиологических и биотехнологических проблем интегрированного управления прибрежными зонами" № АААА-А18-118021350003-6 и частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00672.

Список литературы / References:

1. Козел Н.В., Доманский В.П., Мананкина Е.Е., Адамчик К.О. [и др.] Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis*. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*, 2015, № 2, с. 44-49. [Kozel N.V. Domansky V.P., Manankina E.E., Adamczyk K.O. [et al.] The effect of the spectral composition of the led emission on the structure of the Spirulina platensis photosynthetic apparatus. *Vesci Nacyyanal'naj akadehmii navuk Belarusi*, 2015, no. 2, pp. 44-49. (In Russ.)]

2. Huanyang W. Effect of different light qualities on growth, pigment content, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in the red alga *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta). *Biomed. Res. Int.*, 2016, DOI: 10.1155/2016/7383918.

3. Nwoba E.G. Effect of selected light spectra on the growth of Chlorella spp. (Chlorophyta). *Nig. J. Biotech.*, 2017, vol. 32, pp. 69-76, DOI: 10.4314/njb.v32i1.10.

4. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13), URL: http://algology.ru/1097. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified setup for laboratory studies of microalgae. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2017, no. 1 (13), URL: http://algology.ru/1097. (In Russ.)]

5. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 1, с. 53-60, DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Morskoj biologicheskij zhurnal*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 53-60, DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06. (In Russ.)]

6. Геворгиз Р.Г., Шматок М.Г. Лелеков А.С. Расчёт КПД фотобиосинтеза у низших фототрофов. 1. Непрерывная культура. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 31-36. URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=25457247. [Gevorgiz R.G., Shmatok M.G., Lelekov A.S. Calculation of photobiosynthesis efficiency in lower phototrophs. 1. Continuous culture. *Ekologiya morya*, 2005, vol. 70, pp. 31-36, URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=25457247. (In Russ.)]

THE PRODUCTIVITY AND EFFICIENCY OF PHOTOBIONTS SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS UNDER DIFFERENT SPECTRAL COMPOSITION OF THE LED EMISSION

Gavrilov P.E.[1], Kostylev A.A.[1], Lelekov A.S.[2], Malakhov A.S.[3]
[1] Sevastopol State University
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: havrilovpyotr@gmail.com
[2] Institute of Marine Biological Research A.O. Kovalevsky
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov @ yandex.ru
[3] National research Tomsk Polytechnic University
Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: mac89@mail.ru

Abstract. The study of the *Spirulina platensis* batch culture growth in the different spectral composition of the led radiation in the plane-parallel photobioreactors was carried out. The powerful (50 W) warm, cold light, and phyto LEDs were used in the experimental variants. The grid of 10 fluorescent lamps TDM Electric 18 W were used in the control variant as the light source. It is shown that the maximum productivity of the *S. platensis* does not depend on the led emission spectrum and was 0.37 g $SW \cdot l^{-1} \cdot d^{-1}$. In the control variant the maximum productivity was 30 % lower. The maximum value of the *S. platensis* biomass is achieved by using a powerful led of cold light. In the linear growth phase, the calculated efficiency of the light energy conversion (the efficiency photobiosynthesis): for the phyto led this value was minimal and equivalent to 1.67 %; for the warm led the value was maximum and equivalent to 6,47 %.
Key words: *photoautotrophs, batch culture, maximum productivity, photobiosynthesis, powerful led.*

СООТНОШЕНИЕ РЕЗЕРВНЫХ И СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ БИОМАССЫ КАК КЛЮЧЕВОЙ ПАРАМЕТР РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С.

Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov @yandex.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Работа посвящена анализу существующих математических моделей, описывающих зависимость продуктивности микроводорослей от различных факторов среды, и выявлению ключевых параметров, которые могут быть положены в основу теории роста культуры низших фотоавтотрофов. Показано, что максимальные скорости роста микроводорослей определяются содержанием ключевого фермента или переносчика в клетке, участвующего в реакциях энергообмена. Применение метода линейных сплайнов при описании зависимости продуктивности или удельной скорости роста от внешних параметров среды или внутренних параметров культуры позволяет чётко определить границы лимитированного роста, а также получить простые интегральные решения динамики плотности биомассы или её компонентов от времени. Для условий лимитированного роста продуктивность культуры линейно связана с величиной приведённой плотности потока субстрата или соотношением резервных и структурных компонентов биомассы.

***Ключевые слова**: продуктивность, удельная скорость роста, приведённая плотность потока, лимитирующий фактор, лимитирующее звено, метод линейных сплайнов.*

Исследования зависимости скорости роста культуры микроводорослей от абиотических факторов среды занимают одно и центральных мест в современной альгологии. Полученные данные позволяют судить об общих тенденциях роста микроводорослей, их восприимчивости к различным условиям. Особое место занимают исследования субстратзависимого роста микроводорослей, проводимые на культурах. Главным достоинством использования культур является возможность получения воспроизводимых результатов, которые позволяют находить не только закономерности влияния экологических факторов среды на выращиваемые объекты, но и дать количественную оценку этого влияния. Без таких данных невозможно изучение метаболических процессов, происходящих на клеточном, организменном или популяционном уровнях. Количественная оценка экспериментальных результатов подразумевает расчёт или определение конкретных параметров роста. К основным ростовым параметрам можно отнести продуктивность культуры или скорость роста (валовая, средняя, максимальная), темп деления или удельная скорость роста, максимальная биомасса при накопительном культивировании, удельная скорость поддержания (эндогенного расхода), экономический коэффициент или потребность клеток в субстрате. Среди встречающихся в литературе биохимических параметров отметим концентрацию, содержание, продукцию (скорость синтеза) какого-либо компонента биомассы. К энергетическим отнесём эффективность преобразования энергии клетками (КПД фотобиосинтеза), интегральный коэффициент поглощения энергии и пр.

Количество исследований роста и биохимического состава микроводорослей в культуре огромно и составляет тысячи опубликованных экспериментальных работ. Большинство опытов проведено с периодической культурой микроводорослей и практически без использования математического анализа данных с помощью даже простейших моделей роста. Несмотря на относительно небольшое число экспериментальных работ с непрерывными культурами микроводорослей, основные успехи в области изучения роста микроводорослей достигнуты именно при работе в таких режимах выращивания. Особенностью непрерывных культур является возможность достижения динамически равновесного состояния. В этом случае стабилизируются все характеристики культуры, строго контролируется воспроизводимость результатов, любой анализ производится без вмешательства в процессы роста. Здесь появляется возможность определения удельной скорости роста с любой заданной точностью, а выполняющееся условие: все удельные скорости равны и равны удельной скорости протока, – позволяет находить зависимости биохимического состава клеток от условий внешней среды. Более сложная ситуация наблюдается в периодической культуре микроводорослей, когда вмешательство в процессы роста нежелательны, но без отбора проб невозможен анализ состояния культуры и приходится искать компромисс, который каждый исследователь находит произвольно. Это приводит к ограничению сопоставимости результатов.

Накопленные к настоящему моменту знания о росте и фотосинтезе микроводорослей, особенно в области управляемого фотобиосинтеза, вместе с уже устоявшимися представлениями и принципами биологии и биофизики, позволяют вплотную подойти к решению проблем, связанных с созданием теории роста микроводорослей в культуре. Разработка кинетической теории роста микроводорослей и появляющаяся при этом возможность математического моделирования очень важна не только с точки зрения практики, но и возможностей приложения в научных исследованиях.

Основная цель настоящей работы – анализ существующих подходов и разработка новых представлений, которые могут быть положены в основу кинетической теории роста микроводорослей в культуре.

Классические математические модели роста микроводорослей в накопительной культуре.

Математическое моделирование роста микроводорослей в накопительной культуре основывается на представлениях субстрат-зависимого роста по аналогии с ферментативной кинетикой: модель Моно, логистическая функция Ферхюльста-Пирля, либо их производные [1]. Указанные математические модели широко применяются при исследовании влияния различных факторов среды на скорость роста, а также используются при математическом описании накопления биологически ценных веществ. Для проточных культур микроводорослей использование уравнения Моно позволяет описать данные с высокой точностью, но применение его для накопительной культуры требует некоторых оговорок. В процессе накопительного роста культуры (особенно для плотных культур) клетки микроводорослей постоянно адаптируются к изменяющимся условиям, при этом биохимический состав биомассы может варьировать в широких пределах. С ростом величины биомассы обычно происходит смена лимитирующего фактора, ограничивающего скорость роста микроводорослей. Следовательно, уравнения, основанные на представлениях Моно, не применимы для описания всей накопительной кривой.

Довольно ограниченное количество теоретических работ, посвящённых моделированию динамики роста накопительной культуры, связано с тем, что решения дифференциальных уравнений для нестационарного процесса трудно представить в элементарных аналитических функциях. Так как при накопительном культивировании происходит смена лимитирующего фактора, накопительную кривую нельзя описать одним уравнением. Кривую следует разбивать на несколько участков, величина которых может варьировать в зависимости от внешних условий среды и индивидуальных особенностей клеток: 1. Можно выделить область, где рост ограничен внутренней организацией "узкого места" метаболизма, при этом удельная скорость роста постоянна и максимальна, а мы имеем дело с экспоненциальным ростом; 2. Можно выделить область, где скорость роста зависит от внешней концентрации лимитирующего субстрата. Возможно разделение накопительной кривой и на большее количество фаза роста. Так в [2] показано, что при культивированиии микроводорослей в плоскопаралельных фотореакторах наблюдается линейня фаза роста, обусловленная гиперболическим снижением средней пространственной облучённости. Для культур микроводорослей линейный рост также может быть связан с газовым обеспечением [3]. Любая накопительная кривая характеризуется наличием стационарной фазы роста, которая мало изучена, поскольку для биотехнологии не представляет интерес с точки зрения реализации максимальных продуктивностей. В стационарной фазе наблюдаемая продуктивность равна нулю, при этом клетки микроводорослей способны накапливать ценные биологически активные вещества: углеводы, липиды, экзометаболиты и т. д. Исследование динамики биомассы накопительной культуры микроводорослей показало, что в стационарной фазе роста возможны колебания [4]. Остается невыясненным вопрос о природе подобных процессов, являются ли периодические изменения плотности вынужденными или автоколебаниями.

Таким образом, оперируя классическими параметрами биомассы, концентрацией лимитирующего субстрата и его потребностью и др., по-видимому, невозможно предложить модель, которая объясняет рост накопительной культуры микроводорослей. Для построения такой модели необходимо введение новых параметров, которые учитывают современные представления об организации узкого места метаболизма, о потоках лимитирующего субстрата в узкое место метаболизма и т. д.

Максимальные скорости синтеза биомассы. Основой метаболизма микроводорослей является фотосинтез. В процессе фотосинтеза выделяют две стадии: световую и темновую. Световая стадия включает этапы от поглощения света пигментами до фосфорилирования, при котором низкоэнергетические формы аденозинфосфатов (АДФ) и никотинамидадениндинуклеотидфосфатов (НАДФ+) восстанавливаются до высокоэнергетических форм (АТФ и НАДФ·Н). Темновая стадия представляет собой цикл Кальвина, при котором за счёт энергии окисления АТФ и НАДФ·Н до АДФ и НАДФ+ из минерального углерода синтезируется органический углерод. Синтез биомассы из биогенных элементов представляет собой разветвленную цепь ферментативных и транспортных реакций и происходит также с участием энергии окисления АТФ и НАДФ·Н [5-7].

Многие виды микроводорослей являются облигатными фототрофами (особенно ярко это выражено у некоторых видов синезелёных водорослей), для них характерно разделение процессов энергетического и конструктивного метаболизма, а единственным источником энергии для синтеза биомассы являются макроэрги АТФ и НАДФ·Н. Базируясь на такой простейшей обобщенной модели, рост микроводорослей можно представить как процесс биосинтеза химических структур клетки из минеральных веществ за счёт энергии высокопотенциальных форм макроэргов (E_+), т.е., рост микроводорослей можно рассматривать как совокупность энергообменных реакций. Соответственно, понятия скорости роста и скорости энергообмена являются эквивалентными, а предельные скорости энергообмена будут определять предельные скорости роста. Максимальные скорости энергообмена могут реализоваться только при всех благоприятных физико-химических условиях среды (температура, pH, полное минеральное и световое обеспечение и т.д.). В этом случае максимальная скорость синтеза биомассы будет пропорциональна общему количеству ключевого фермента (или переносчика) и максимальной эффективности преобразования энергии макроэргов в химическую энергию, запасенную в биомассе. Если биомасса (B) содержит ключевой комплекс (F_0) в количестве f на единицу биомассы ($f=F_0/B$), а максимальная эффективность преобразования энергии макроэргов в химическую энергию биомассы – φ^0, то для максимальной скорости синтеза биомассы можно записать:

$$P_{max}^{0} = \frac{\varphi^{0}}{\theta^{0}} \varsigma \left(\frac{dE_{+}}{dt} \right)_{max} = \frac{\varphi^{0}}{\theta^{0}} \varsigma \mu^{e} F_{0} = \frac{\varphi^{0}}{\theta^{0}} \varsigma f \mu^{e} B. \quad (1)$$

где θ^0 – коэффициент перевода энергетических единиц в единицы биомассы, который обычно называют калорийностью биомассы; ς – свободная энергия одной молекулы макроэрга; μ^e – активность ключевого фермента.

Величина максимальной скорости синтеза биомассы не может являться независимым параметром для характеристики роста, т. к. зависит от количества фермента или биомассы. Разделив максимальную скорость синтеза на биомассу, получим максимальную удельную скорость роста:

$$\mu_{max} = \frac{P_{max}^{0}}{B} = \frac{\varphi^{0}}{\theta^{0}} \varsigma f \mu^{e}. \quad (2)$$

По сути, определяемая таким образом максимальная удельная скорость роста не зависит от внешних потоков минерального и энергетического (светового) питания микроводорослей. Из формулы видно, что максимальная удельная скорость роста определяется содержанием ключевого фермента или переносчика в клетке, участвующего в реакциях энергообмена. Количественно это содержание отражает величина *f*. В кинетическом смысле данная характеристика количественно отражает понятие, называемое в биокинетике лимитирующим звеном или узким местом метаболизма.

Метод линейных сплайнов (метод касательных).

В случае лимитированного роста продуктивность культуры, в соответствии с принципами минимума и "узкого места", определяется потоком лимитирующего субстрата (количество молекул, приходящее на единицу площади в единицу времени), а также количеством и активностью ключевого фермента, который перерабатывает данный субстрат. Обозначим через (λ) величину приведённой плотности потока лимитирующего субстрата в "узкое место" метаболизма:

$$\lambda_i = \frac{\varphi_e \cdot I_n}{\mu_e \cdot F_0}, \; \lambda_s = \frac{\varphi_e \cdot I_s}{\mu_e \cdot F_0},$$

где I_n – плотность потока квантов фотосинтетически активной радиации (ФАР), поглощаемых культурой, квант/(м^2·с); φ_e – число молекулы макроэрга, восстанавливающихся за счёт одного кванта, мол./квант; μ_e – активность ключевого комплекса, регулирующего энергообмен в клетке, 1/с; F_0 – число ключевых регуляторов энергообмена, приходящееся на единицу освещаемой поверхности культуры, мол./м^2 (для λ_s – аналогично).

Идеализированная модель взаимосвязи скорости или удельной скорости синтеза биомассы с λ для светового или минерального ограничения будет иметь вид:

$$\mu_{norm} = P_{norm} = \begin{vmatrix} \lambda_s; \lambda_s \le \lambda_i \\ \lambda_i; \lambda_s \ge \lambda_i \\ 1; \lambda_i \ge 1, \lambda_s \ge 1 \end{vmatrix}, \quad (3)$$

где μ_{norm}, P_{norm} – нормированная (на максимальную) продуктивность и удельная скорость синтеза биомассы.

Достоинством (3) является чёткое определение точки смены лимитирующего фактора или звена, если рассмотреть поток субстрата внутри клетки. В окрестностях этой точки возможны отклонения экспериментальных данных от идеализированной ломанной (3). Для повышения точности описания экспериментальных данных мы можем разбить кривую на большее количество участков, каждый из которых опишем линейным сплайном. Метод линейных сплайнов или метод касательных широко применяется во многих науках, позволяя описать сложные процессы простыми уравнениями. Применительно к биокинетике, ранее показано [8], что внутренняя организация "узкого места" метаболизма определяет характер зависимости скорости процесса от приведённой плотности потока: чем лучше организована система, тем ближе эта зависимость к ломаной (3); самой низкопродуктивной организации соответствует гиперболическая зависимость, выражаемая уравнением Михаэлис-Ментен.

Общее уравнение (3) может быть записано как для внешних потоков, так и для потоков лимитирующего субстрата на ключевой фермент внутри клетки. Вычленим в общей биомассе (B) клетки две основные макромолекулярные формы – структурную (B_{str}) и резервную (B_{res}):

$$B = B_{str} + B_{res}.$$

В процессе метаболизма микроводорослей скорость синтеза биомассы будет определяться суммой скоростей синтеза структурных и накопления или расхода ресурсных составляющих:

$$\frac{dB}{dt} = \frac{dB_{str}}{dt} + \frac{dB_{res}}{dt}.$$

Скорость синтеза структуры определяется количеством ресурсной биомассы, а также активностью ключевого фермента. Скорость образования ресурсных составляющих определяется приведенной плотностью потока внешнего субстрата. Если скорость синтеза некоторых промежуточных соединений (интермедиатов) выше скорости образования структуры, то в клетке будут накапливаться резервные соединения, в противном случае, количество интермедиатов будет уменьшаться. Обозначим через ε величину соотношения структурной и резервной биомассы:

$$\varepsilon = \frac{B_{res}}{B_{str}}.$$

Таким образом, если соотношение ε больше либо равно некоторому насыщающему значению $\varepsilon \geq \varepsilon_{sat}$, скорость синтеза структуры будет максимальна, при $\varepsilon < \varepsilon_{sat}$, скорость будет линейно зависеть от ε:

$$\mu_{str}^{norm} = P_{str}^{norm} = \frac{q_{rs}}{\varepsilon_{sat}} \begin{vmatrix} \varepsilon; \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{vmatrix}, \quad (4)$$

где q_{rs} – экономический коэффициент преобразования резервной в структурную биомассу.

Скорость образования резервной составляющей биомассы будет определяться приведённой плотностью потока субстрата λ_S согласно (3). Отметим, что уравнения (3) и (4) эквивалентны. Величина приведённой плотности потока λ в (3) – неизмеряемый параметр. В свою очередь в (4) скорости выражены через измеряемую величину ε, которую можно определить биохимически. Приведём некоторые примеры использования (4) для описания роста культуры микроводорослей в тех или иных условиях.

Светозависимый рост.

Рассматривая влияние света на синтез биомассы микроводорослей в фотоавтотрофной культуре необходимо учитывать последовательность световых и темновых реакций, при которых ассимилируется минеральный углерод и за счет световой энергии в цикле Кальвина преобразуется в полисахариды (B_{res}). В свою очередь, эти первичные углеводы служат источником энергии и углеродных скелетов для всех последующих процессов биосинтеза клеточных структур (B_{str}). Систему уравнений, описывающую динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей при фотоавтотрофном росте:

$$\begin{cases} \dfrac{dB_{str}}{dt} = \dfrac{\mu_{mrs} q_{rs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{vmatrix} \varepsilon; \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{vmatrix} - \mu_r B_{str} \\ \dfrac{dB_{res}}{dt} = \dfrac{\mu_m B_{str}}{I_{0sat}} \begin{vmatrix} I_0; I_0 < I_{0sat} \\ I_{0sat}; I_0 \geq I_{0sat} \end{vmatrix} - \dfrac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} B_{str} \begin{vmatrix} \varepsilon; \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}; \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{vmatrix} \end{cases},$$

где – μ_{rs} удельная скорость трансформации ресурсных веществ в структурные; μ_r – удельная скорость естественного распада структур; I_0 – внешняя облучённость

Таким образом, если рассматривать влияние света на роста культуры микроводорослей, можно сделать вывод, что продуктивность в целом зависит как от условий освещения (I_0), так и от соотношения ресурсных и структурных составляющих биомассы клеток (ε).

Субстратзависимый рост.

Рассмотрим рост культуры микроводорослей в условиях недостатка азота. Азотистые соединения, находящиеся в клетках N_{cell}, представим в виде двух основных частей: структурные и резервные формы. К структурной части относим азот, связанный в структуре клеточной массы N_{str}. Эта часть биомассы в основном представлена белками. Резервная часть азота в клетках N_{res} представлена той частью, которая еще не вошла в структурные формы и рассматривается как субстрат в последовательности метаболических реакций (интермедиаты) [9]. Обозначим через $\varepsilon_{r/s}$ и $\varepsilon_{N/s}$ отношение концентрации резервного азота и концентрации внеклеточного азота к структурному:

$$\varepsilon_{r/s} = \frac{N_{res}}{N_{str}}, \varepsilon_{N/s} = \frac{N}{N_{str}}.$$

Систему дифференциальных уравнений, описывающих изменение форм азота микроводорослей в культуре можно представить в виде:

$$\begin{cases} \dfrac{dN_{str}}{dt} = \mu_m N_{str} \dfrac{1}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} \begin{vmatrix} \varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{r/s} \le \varepsilon_{r/s}^{sat}; \\ \varepsilon_{r/s}^{sat}, \varepsilon_{r/s} \ge \varepsilon_{r/s}^{sat}; \end{vmatrix}, \\ \dfrac{dN_{res}}{dt} = \mu_{Nm} N_{str} \dfrac{1}{\varepsilon_{N/s}^{sat}} \begin{vmatrix} \varepsilon_{N/s}, \varepsilon_{N/s} \le \varepsilon_{N/s}^{sat}; \\ \varepsilon_{N/s}^{sat}, \varepsilon_{N/s} \ge \varepsilon_{N/s}^{sat}; \end{vmatrix} - \mu_m N_{str} \dfrac{1}{\varepsilon_{r/s}^{sat}} \begin{vmatrix} \varepsilon_{r/s}, \varepsilon_{r/s} \le \varepsilon_{r/s}^{sat}; \\ \varepsilon_{r/s}^{sat}, \varepsilon_{r/s} \ge \varepsilon_{r/s}^{sat}; \end{vmatrix}. \end{cases}$$

где μ – удельная скорость роста культуры, сут$^{-1}$; N – концентрация азота в среде, г/л; N_{res1}, N_1 – насыщающие концентрации резервного и азота в среде, при которых скорость достигает максимального значения; μ_{Nm} – максимальная удельная скорость поступления азота в клетки, сут$^{-1}$; μ_m – максимальная удельная скорость включения азота в структуру клетки (или синтеза структурных компонентов), сут$^{-1}$.

Форма зависимости макромолекулярного состава биомассы микроводорослей от азота определяется соотношением значений притока азота извне и синтеза структурных компонентов клеток. Достоинством предложенного подхода является возможность получения простых интегральных решений системы в конкретных условиях.

Заключение.

Предложенная в работе модель зависимости скорости от приведённой плотности потока лимитирующего субстрата λ в виде линейных сплайнов есть идеализация, которая позволяет получить простые уравнения связи ключевых видоспецифических параметров микроводорослей, а также определить точку переключения лимитирующих факторов. В точных науках линейная идеализация позволяет сформулировать законы, которые в дальнейшем приводят к возникновению теории. В данной работе показано, что описание линейными сплайнами зависимости скорости роста от соотношения резервных и структурных компонентов биомассы ε имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение, так как ε, в отличие от λ, есть измеряемая величина. Интегрируя (4) для условий накопительной культуры, можно получить простые аналитические формулы динамики изменения биомассы или её компонентов во времени, верификация которых не представляет трудности.

Работа выполнена в рамках госзадания по НИР «Разработка научных основ решения гидробиологических и биотехнологических проблем интегрированного управления прибрежными зонами" № АААА-А18-118021350003-6.

Список литературы / References:

1. Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Гаврилов П.Е. Динамическая модель субстратзависимого роста накопительной культуры микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2016, № 2 (12), URL: http://algology.ru/970. [Lelekov A.S., Gevorgiz R.G., Gavrilov P.E. Dynamic model of substrate-dependent growth of microalgae batch culture. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2016, no. 2 (12), URL: http://algology.ru/970. (In Russ.)]

2. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Новикова Т.М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре. *Морской биологический журнал*, 2018, т. 3, № 1, с. 53-60, DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Novikova T.M. Linear growth of marine microalgae in culture. *Morskoj biologicheskij zhurnal*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 53-60, DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06. (In Russ.)]

3. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. *Моделирование роста микроводорослей в культуре*. Севастополь: ООО "Константа-Принт", 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth in culture*. Sevastopol: OOO "Konstanta-Print", 2017, 152 p. (In Russ.)]

4. Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г. Динамика плотности культуры микроводорослей в стационарной фазе роста. *Бюллетень Государственного Никитского Ботанического Сада,* 2013, 108, с. 39-44, URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=23916885. [Lelekov A.S., Gevorgiz R.G. Dynamics of microalgae culture density in the stationary growth phase. *Bulletin Of The State Nikitsky Botanical Garden,* 2013, 108, pp. 39-44, URL: https://elibrary.ru/item.asp?id=23916885. (In Russ.)]

5. Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В., Брезински А., Кернер К. *Ботаника. Том 2. Физиология растений*. М: Академия, 2008, 496 с. [Zitte P., Weiler E.W., Kadereit V., Bresinsky A., Koerner K. *Botany. Volume 2. Plant physiology*. M: Academia, 2008, 496 p. (In Russ.)]

6. Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. *Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты*. М: Академия, 2006, 448 с. [Mokronosov A.T., Gavrilenko V.F., Zhigalova T.V. *Photosynthesis. Physiological, ecological and biochemical aspects*. M: Academia, 2006, 448 p. (In Russ.)]

7. Рубин А.Б., Кренделева Т.Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза. *Успехи биологической химии,* 2003, 43, с. 225-266. [Rubin A.B., Krendeleva T.E. regulation of primary processes of photosynthesis. *Uspekhi biologicheskoj himii*, 2003, 43, pp. 225-266. (In Russ.)]

8. Тренкеншу Р.П. *Кинетика субстратзависимых реакций при различной организации метаболических систем*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005, 89 с. [Trenkenshu R.P. *Kinetics of substrate-dependent reactions in different organization of metabolic systems*. Sevastopol: EHKOSI-Gidrofizika, 2005, 89 p. (In Russ.)]

9. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Модель трансформации форм азотистых соединений клетками. *Вопросы современной альгологии*, 2018, № 1 (16), URL: http://algology.ru/1247. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. Model of

transformation of the nitrogen compounds by microalgae cells. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2018, no. 1 (16), URL: http://algology.ru/1247. (In Russ.)]

THE RESERVE AND STRUCTURAL COMPOUNDS OF BIOMASS RATIO AS A KEY PARAMETER FOR THE MICROALGAE GROWTH

Trenkenshu R.P., Lelekov A.S.
Institute of Marine Biological Research. A.O. Kovalevsky
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov @ yandex.ru

Abstract. The work is devoted to the analysis of existing mathematical models describing the dependence of the microalgae productivity on environmental factors, and the identification of key parameters that can be the basis of the theory lower photoautotrophs culture growth. It is shown that the maximum growth rates of microalgae are determined by the content of the key enzyme or carrier in the cell involved in energy exchange reactions. The use of the linear spline method in describing the dependence of productivity or specific growth rate on the external environmental parameters or internal parameters of the culture allows to clearly define the limits of limited growth, as well as to obtain simple integrated solutions of the dynamics of biomass density or its components. For conditions of limited growth, the productivity of culture is linearly related to the value of the reduced flux density of the substrate flow or the ratio of reserve and structural biomass compounds.

Key words: *productivity, specific growth rate, reduced flux density, limiting factor, limiting link, linear splines.*

АВТОМАТИЧЕСКОЙ ДАТЧИК РЕГИСТРАЦИИ СУТОЧНЫХ КОЛЕБАНИЙ ОСВЕЩЁННОСТИ В РАЙОНЕ Г. СЕВАСТОПОЛЯ

Чекушкин А.А.[1], Лелеков А.С.[2], Тренкеншу Р.П.[2]

[1] Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

[2] Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov @yandex.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. В данной работе предложен автоматический датчик измерения освещённости и температуры на базе платформы Arduino Nano. Основным элементом датчика являлся CdS фоторезистор GL12516, максимум поглощения световой энергии которого приходится в зелёную область спектра. Температура измерялась с помощью датчика LM 35. Данные с заданным временным интервалом записываются на Micro SD карту памяти. Датчик был откалиброван в условиях тепличного модуля для промышленного выращивания микроводорослей, расположенного на базе радиобиологического корпуса ИМБИ им. А. О. Ковалевского РАН г. Севастополя. Показано, что напряжение и освещённость связаны между собой нелинейно, определены коэффициенты эмпирической функции зависимости освещённости от напряжения на фоторезисторе. Проведена апробация датчика, приведены суточные изменения освещённости на поверхности бассейна с культурой *Dunaliella salina*, а также изменения температуры.

***Ключевые слова**: платформа Arduino Nano, фоторезистор GL12516, термодатчик LM 35, моделирование, Dunaliella salina.*

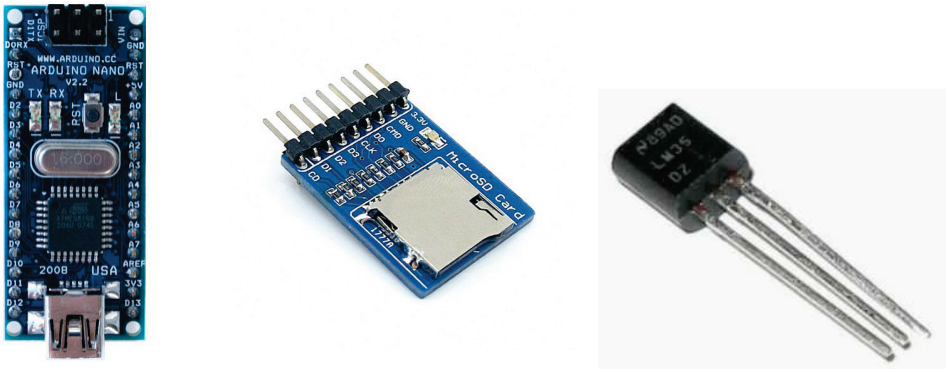
Исследования закономерностей, связывающих эффективность, скорость фотобиосинтеза микроводорослей и обеспеченность световой энергией, являются одной из актуальных задач в современной физиологии фотоавтотрофных организмов. Известно, что при выращивании микроводорослей в условиях естественного освещения, наблюдаются суточные колебания скорости роста культуры и продукции основных биохимических компонентов (белков, жиров, углеводов). В течение светового периода (днём) в клетках микроводорослей наблюдается накопление полисахаридов и липидов, а в ходе темнового содержание данных веществ уменьшается [1, 2]. Массово микроводоросли, как правило, выращивают в открытых или закрытых фотобиореакторах под открытым небом, что обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. Как следствие, большинство работ в этой области носят прикладной биотехнологический характер. В работе [3] авторы моделируют взаимосвязь продуктивности культуры микроводорослей с облучённостью поверхности бассейна в зависимости от времени года. В работе [4] разработана комплексная математическая модель, которая устанавливает взаимосвязь продуктивности культуры микроводорослей со световыми, температурными условиями, концентрацией основных биогенных элементов, растворенного кислорода. В работе [5] предложена математическая модель роста диатомовой водоросли *Isochrysis galbana* в условиях открытых бассейнов. Модель учитывает влияние глубины бассейна, концентрации хлорофилла а на продуктивность культуры для различных времен года.

Таким образом, первым шагом при моделировании влияния периодически изменяющихся световых условий на продуктивность культуры и продукцию основных биохимических составляющих является разработка автоматической системы контроля основных параметров внешней среды. Световые условия – ключевой фактор, который определяет скорость роста и продукцию того или иного компонента биомассы микроводорослей. Современные приборы для измерения светового обеспечения микроводорослей можно разделить на три группы: 1. Люксметр предназначен для измерения освещённости в видимой области спектра (380 ÷ 760) нм, создаваемой различными источниками, произвольно пространственно расположенными (единицы измерения – люксы); 2. Пиранометр – применяется для измерений энергетической облучённости, создаваемой солнечным излучением и другими источниками непрерывного оптического излучения в диапазоне длин волн от 300 нм до 2400 нм (единицы измерения Вт/м^2); 3. Квантометр – измеряет количество квантов в области ФАР (единицы измерения мкмоль/(м^2·с). Автоматические средства контроля световых условий являются дорогостоящим оборудованием, либо выполнены под задачи конкретного исследования или производства.

Целью данной работы являлась разработка, сборка и калибровка автоматического датчика для определения суточных изменений освещённости в районе г. Севастополя, удовлетворяющего следующим требованиям: 1. Простота, надёжность, минимальная стоимость конструкции; 2. Все составные части должны быть стандартного фабричного производства.

Автоматический датчик на основе платформы Arduino Nano.

Платформа Arduino Nano, построенная на микроконтроллере ATmega168, разработана компанией Gravitech, имеет небольшие размеры, невысокую стоимость и может использоваться в научных исследованиях. Платформа может получать питание через USB-подключение или от регулируемого 6-20 В внешнего источника. В нашей схеме для стабильной работы Arduino Nano использовался импульсный понижающий регулируемый стабилизатор постоянного напряжения DC-DC LM2596. Микроконтроллер ATmega168 поставляется с



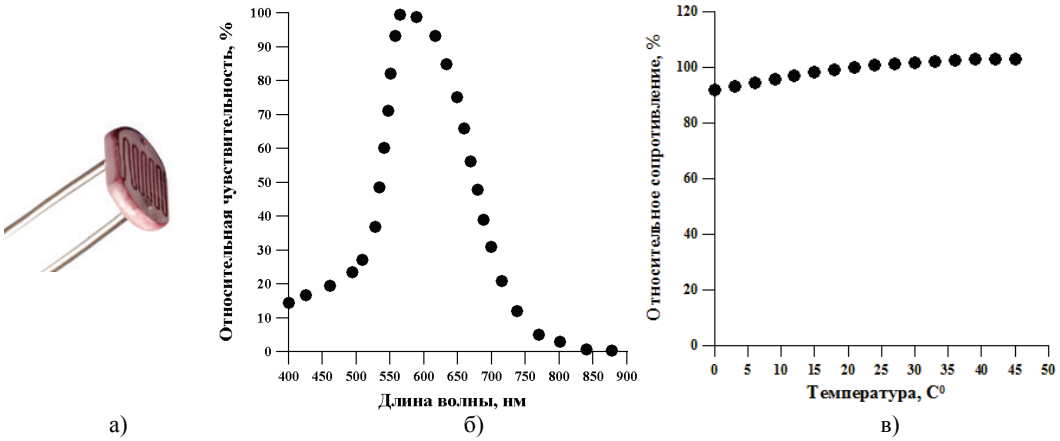
а) б) в)

Рисунок 1. Платформа Arduino Nano. (а) – внешний вид; (б) – Модуль MicroSD Card; (в) – температурный датчик LM 35

записанным загрузчиком, облегчающим компиляцию новых программ без использования внешних программаторов. Платформа программировалась посредством свободного ПО Arduino (www.arduino.com). Запись данных, полученных с аналоговых входов, осуществлялась в текстовый файл на 2 Gb SD-карту памяти, которая подключалась с помощью модуля MicroSD Card к контактам платы: CS к D4, SCK к D13, MOSI к D11, MISO к D12. Температура измерялась с помощью датчика LM 35, центральный контакт которого подключался к аналоговому входу Arduino Nano.

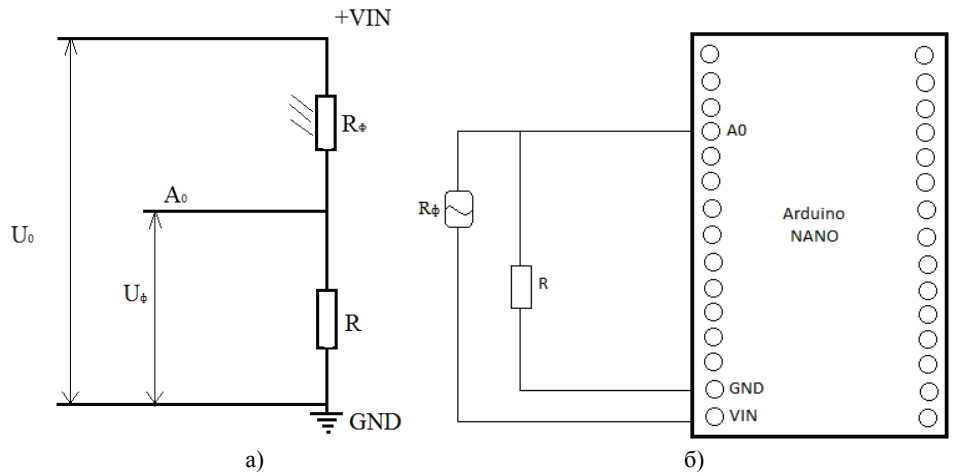
Основным элементом датчика являлся CdS фоторезистор GL12516. На рисунке 2 представлен внешний вид, спектральная чувствительность и зависимость сопротивления резистора от температуры. Отметим, что максимум поглощения световой энергии приходится в зелёную область спектра, что имеет значение при записи освещённости в области ФАР. В параллельных экспериментах вместо фоторезистора использовали фотоэлемент от садового светильника на солнечных батареях Solar mini, спектральная характеристика которого затрагивает ИК область. Экспериментально установлено, что при высоких температурах, которые наблюдаются в яркий солнечный день, показания фотоэлемента Solar mini во многом зависят именно от температуры, нежели от поглощаемой световой энергии. Таким образом, использование данного фотоэлемента в дальнейших экспериментах являлось нецелесообразным. Принципиальная (а) и монтажная (б) схема подключения фоторезистора GL 12516 к платформе Arduino Nano представлены на рисунке 3.

Для калибровки датчика установим взаимосвязь внешней освещённости (E) и напряжения ($U_ф$), которое регистрирует микроконтроллер. Для этого рассмотрим принципиальную схему (см. рис. 3а), где U_0 – общее напряжение, $U_ф$ – напряжение на фоторезисторе, R – добавочное сопротивление, $R_ф$ – сопротивление фоторезистора, GND – земля, A_0 – аналоговый вход, VIN – питание. В схеме фоторезистор реализован как делитель напряжения, на одном плече которого сопротивление меняется в зависимости от уровня освещённости. Так как сопротивление фоторезистора при попадании на него света уменьшается, то и значение падающего на нем напряжения будет снижаться. В зависимости от того, в каком плече делителя поставим фоторезистор, на аналоговый вход будет подаваться или повышенное или пониженное напряжение. В нашем случае, один контакт фоторезистора подключен к питанию, максимальное значение сопротивления будет соответствовать темноте, а минимальное высоким значениям освещённости. Фоторезистор не имеет полярности, поэтому его подключение произвольно. Резистор R в схеме выполняет две функции: ограничивает ток в цепи и формирует нужное напряжение в схеме с делителем. Ограничение тока необходимо, когда полностью освещённый фоторезистор



а) б) в)

Рисунок 2. Фоторезистор GL12516 12 мм (а) – внешний вид; (б) – спектральная характеристика; (в) – зависимость сопротивления от температуры [6]



а) б)

Рисунок 3. Принципиальная (а) и монтажная (б) схема подключения фоторезистора GL 12516 к ARDUINO NANO. Обозначения в тексте

резко уменьшает свое сопротивление. Меняя значение сопротивления R, мы можем регулировать уровень чувствительности к освещённости. Так как в наших условиях максимальная освещённость достигала порядка 100 клк, экспериментально подобрано сопротивление в 72 Ом.

В схеме делитель напряжения представляет собой два последовательно включённых резистора R и $R_ф$, подключённых к источнику напряжения U_0. Поскольку резисторы соединены последовательно, то ток, походящий через них, будет одинаков по первому закону Кирхгофа. Падение напряжения на каждом резисторе, согласно закону Ома для участка цепи, будет пропорционально сопротивлению. Для каждого резистора имеем:

$$\begin{cases} U = I \cdot R \\ U_ф = I \cdot R_ф \end{cases}.$$

Сложив выражения, можно выразить силу тока в цепи, а, следовательно, падение напряжения на каждом резисторе:

$$U + U_ф = U_0 = I \cdot \left(R + R_ф\right), I = \frac{U_0}{R + R_ф},$$

$$U_ф = U_0 \frac{R_ф}{R + R_ф}. \quad (1)$$

Таким образом, для выявления взаимосвязи регистрируемого напряжения $U_ф$ с величиной освещённости, необходимо задать зависимость сопротивления фоторезистора $R_ф$ от освещённости. На рисунке 4а представлена такая зависимость по данным [7] для CdS-фоторезистовов. Так как диапазон данных по [7] довольно узок и ограничивается освещённостью в 1000 лк, нами проведено экспериментальное определение данной зависимости в условиях тепличного модуля для промышленного выращивания микроводорослей, расположенного на базе радиобиологического корпуса ИМБИ им. А.О. Ковалевского РАН г. Севастополя (рис. 4б). Полученные результаты были аппроксимированы эмпирической функцией:

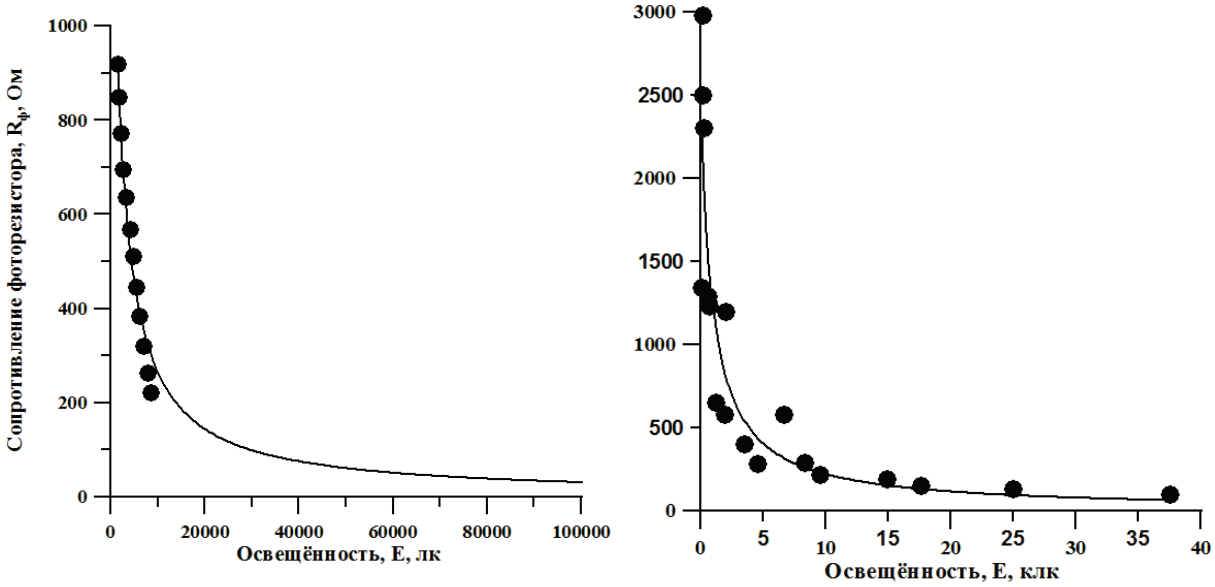
$$R_ф = \frac{a \cdot E}{1 + b \cdot E + c \cdot E^2}, \quad (2)$$

где *a, b, c* – коэффициенты.

Подставляя выражение (2) в (1), получим окончательную формулу взаимосвязи напряжения на фоторезисторе GL 12516 с освещённостью:

$$U_ф = U_0 \frac{a \cdot E}{R + \left(a + b\right) \cdot E + c \cdot E^2}. \quad (3)$$

Уравнение (3) показывает, что напряжение и освещённость связаны между собой нелинейно. В результате аппроксимации (см. рис. 5а), показано высокое соответствие ($R^2 = 0{,}97$) уравнения (3) с экспериментальными данными для условий тепличного модуля на базе ИМБИ г. Севастополя.



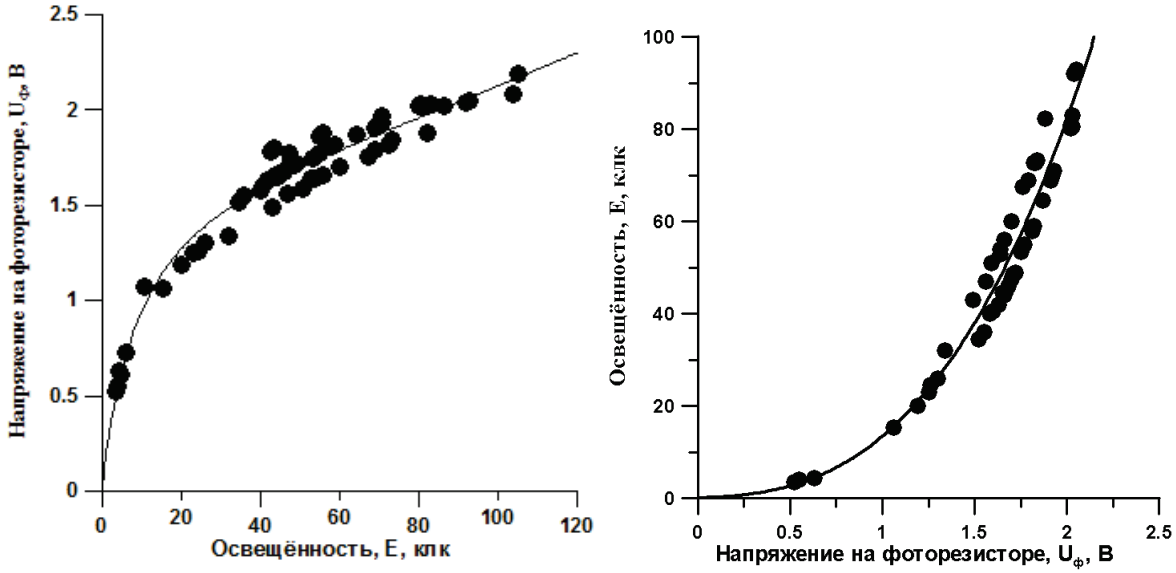
а) б)

Рисунок 4. Зависимость сопротивления фоторезистора от освещённости. а – по данным [7], б – экспериментальные данные для тепличного модуля на базе ИМБИ г. Севастополя. Линия – аппроксимация экспериментальных данных уравнением (2)

В практических расчётах необходимо определять величину освещённости в зависимости от напряжения на фоторезисторе. Такую зависимость можно получить, решая (3) относительно $U_ф$. Однако в виду сложности получаемой формулы, для перевода единиц напряжения в освещённость используем эмпирическое кубическое выражение, расчёт по которому представлен на рисунке 5б:

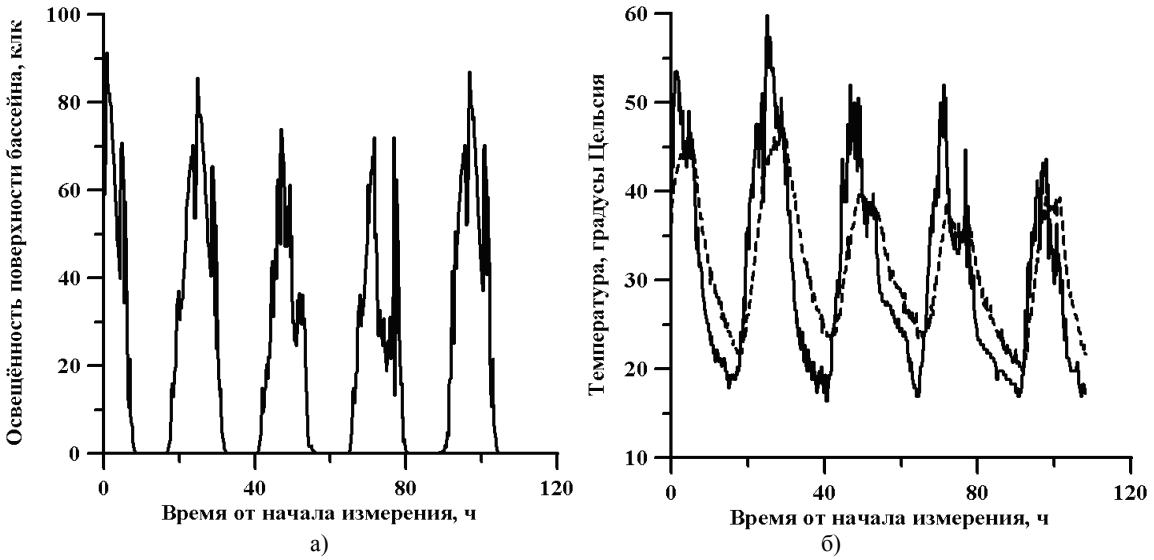
$$E = 7,64 \cdot \left(U_ф + 0,21\right)^3. \quad (4)$$

Апробация полученного калибровочного уравнения проводилась в условиях тепличного модуля, расположенного на базе ИМБИ г. Севастополя с 20.06. по 24.06.18 г. На рисунке 6 представлены суточные изменения освещённости на поверхности бассейна с культурой *Dunaliella salina*, а также изменения температуры воздуха (сплошная кривая) и бассейна (пунктирная кривая). Временной интервал между двумя последующими измерениями был задан в 10 мин. При необходимости данный параметр может быть изменён как в большую, так и в меньшую сторону.



а) б)

Рисунок 5. Зависимость напряжения на фоторезисторе от освещённости. Точки – экспериментальные данные для тепличного модуля на базе ИМБИ г. Севастополя. Линии – аппроксимация экспериментальных данных уравнениями (3) и (4)



а) б)

Рисунок 6. Суточные изменения освещённости (а) и температуры (б) в тепличном модуле на базе ИМБИ г. Севастополя

Заключение.

В данной работе предложен автоматический датчик измерения освещённости и температуры на базе платформы Arduino Nano. К достоинствам данного датчика можно отнести: 1. Простота изготовления; 2. Все комплектующие стандартного фабричного производства, так что в случае выхода из строя одного из них замена не представляет трудностей; 3. Конечная стоимость изделия в десятки раз ниже существующих аналогов. При необходимости освещённость, регистрируемая датчиком, может быть переведена в энергетические единицы [8].

Работа выполнена в рамках госзадания по НИР «Разработка научных основ решения гидробиологических и биотехнологических проблем интегрированного управления прибрежными зонами" № АААА-А18-118021350003-6 и частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-44-920009 р_а.

Список литературы / References:

1. Gibson C.E. Growth rate, maintenance energy and pigmentation of planktonic Cyanophyta during one-hour light: Dark cycles. *British Phycological Journal,* 1985, vol. 20, no. 2, pp.155-161.

2. Тренкеншу Р.П., Новикова Т.М. Простейшие модели роста микроводорослей. 10. Динамика общего биохимического состава клеток. *Морской экологический журнал*, 2014, т. 13, № 4, с. 71-78. URL: http://dspace.marine-research.org/handle/299011/1389. [Trenkenshu R.P., Novikova T.M. The simplest models of microalgae growth. 10. General dynamics biochemical composition cells. *Morskoj ehkologicheskij zhurnal*, 2014, vol. 13, no. 4, pp. 71-78. URL: http://dspace.marine-research.org/handle/299011/1389. (In Russ.)]

3. Grobbelaar J.U. Modeling algal productivity in large outdoor cultures and waste treatment systems. *Biomass*, 1990, vol. 21, pp. 297-314.

4. Hill D.T., Lincoln E.P. Development and validation of a comprehensive model of large-scale production of microalgae. *Agricultural Wasrel*, 1981, vol. 3, pp.43-64.

5. Sukenik A., Levy R.S., Levy Y. [et al.] Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: a simulation model. *Journal of Applied Phycology*, 1991, vol. 3, pp. 191-201.

6. CdS Photoresistor Manual. GL125 Series Photoresistor. URL: https://opencircuit.nl/ProductInfo/1000662/GL12528-Datasheet.pdf.

7. Олеск А.О. *Фоторезисторы*. М. – Л.: Изд-во Энергия, 1966, 128 с. [Olesk A.O. *Photoresistors*. M.: Energia Publishing House, 1966, 128 p. (In Russ.)]

8. Геворгиз Р.Г., Малахов А.С. *Пересчёт величины освещённости фотобиореактора в величину облучённости: учебно-методическое пособие*. Севастополь: ООО "Колорит", 2018, 60 с. URL: http://dspace.marine-research.org/handle/299011/2068. [Georgis G.R., Malakhov A.S. *Recalculation of the illumination value of the photobioreactor in the amount of irradiance: a teaching manual*. Sevastopol: "Kolorit", 2018, 60 p. URL: http://dspace.marine-research.org/handle/299011/2068. (In Russ.)]

AUTOMATIC SENSOR REGISTRATION CIRCADIAN VARIATION OF ILLUMINANCE IN THE SEVASTOPOL REGION

Chekushkin A.A.[1], Lelekov A.S.[2], Trenkenshu R.P.[2]
[1] Sevastopol State University
Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: anatoliy chekushkin @ mail.ru
[2] Institute of Marine Biological Research A. O. Kovalevsky
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov @ yandex.ru

Abstract. In this paper, we propose an automatic sensor for measuring light and temperature on the Arduino Nano platform basis. The main element of the sensor was a CdS photoresistor GL12516, the maximum absorption of light energy which falls in the green range of the spectrum. The temperature was measured using the LM 35 sensor. Data with a specified time interval was recorded on a MicroSD memory card. The sensor was calibrated in the conditions of the hothouse module for industrial cultivation of microalgae, located on the basis of the radiobiological building of IMBI A. O. Kovalevsky RAS of Sevastopol. It is shown that the voltage and illumination are connected with each other non-linearly, the coefficients of the empirical function of the dependence of illumination on the voltage on the photoresistor were determined. The sensor has been tested daily changes of illumination on the surface of the pond with *Dunaliella salina* culture, as well as changes in temperature were given.

Key words: *Arduino Nano platform, GL12516 photoresistor, LM35 temperature sensor, modeling.*

МОДЕЛИРОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СВЕТА НА РАБОЧЕЙ ПОВЕРХНОСТИ ФОТОБИОРЕАКТОРА ДЛЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Малахов А.С.[1], Геворгиз Р.Г.[2], Железнова С.Н.[2]

[1] Национальный исследовательский Томский политехнический университет

пр. Ленина, 30, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: mac89@mail.ru

[2] Институт морских биологических исследований им. А.О.Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru, zheleznovasveta@yandex.ru

Поступила в редакцию: 03.07.2018.

Аннотация. Приведены результаты светотехнического моделирования распределения светового потока на рабочей поверхности фотобиореактора для наиболее часто используемых источников излучения при культивировании микроводорослей. Из результатов видно, как освещенность в разных точках на поверхности фотобиореактора существенно отличается, что изменяет условия свет-темнота. Также показано, что несмотря на внешнее сходство излучаемого света от разных источников излучения, их спектральные составы не одинаковы. Это все оказывает существенное влияние на биосинтез у микроводорослей. Даны рекомендации по описанию световых условий при исследованиях интенсивных культур микроводорослей. Отмечено, что для равномерного распределения светового потока на рабочей поверхности фотобиореактора необходимо использовать светодиодные линейки. Не рекомендуется в качестве источника излучения использовать точечные источники излучения, например, лампы ДРЛ.

Ключевые слова: *световой поток, светодиод, люминесцентная лампа, лампа ДРЛ.*

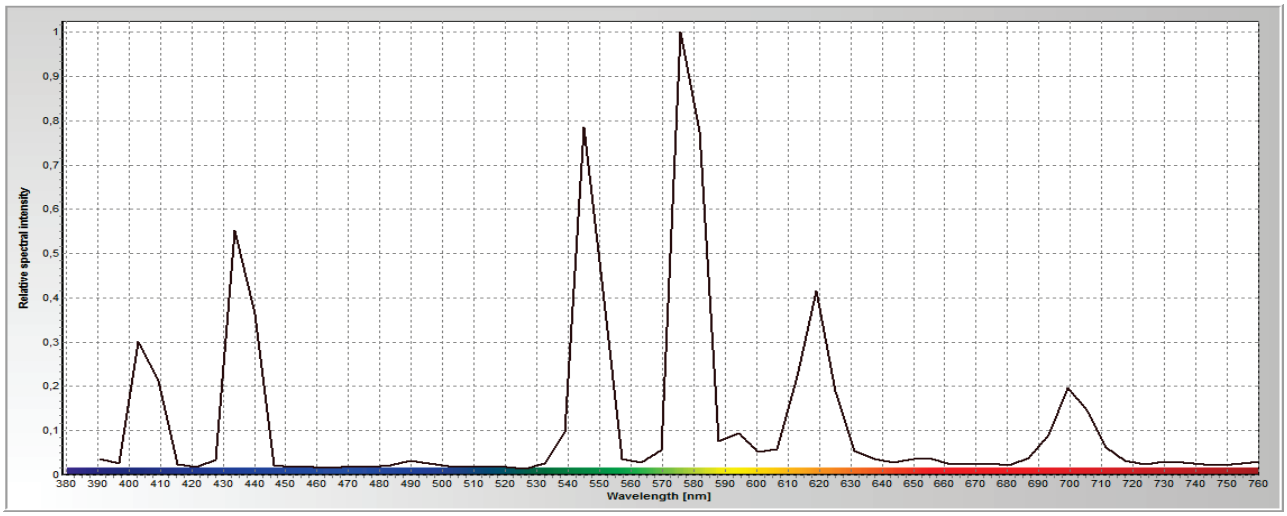
На сегодняшний день в литературе по исследованию влияния световых условий на культуры микроводорослей посвящено значительное число публикаций. В своих работах авторы описывают влияние света на различные внутриклеточные процессы, при этом в описании световых условий чаще всего ограничиваются указанием мощности источника излучения и его цветовой температуры, уровня освещённости рабочей поверхности и длительности периода свет-темнота. А такие важные характеристики как спектральный состав источника излучения и распределение светового поля на рабочей поверхности остаются без внимания. Например, на рисунке 1 представлены 3 источника белого света, у которых в значительной мере различаются спектральные характеристики, несмотря на внешнее сходство излучаемого света. Учитывая то, что спектральный состав света оказывает существенное влияние на биосинтез у микроводорослей [1-3], указание лишь цвета свечения явно недостаточно.

При использовании точечных источников излучения на поверхности фотобиореактора наблюдается неравномерность распределения светового потока. Неравномерность распределения светового потока на поверхности фотобиореактора по сути приводит к трудно формализуемому мерцанию потока излучения, в котором периоды свет-темнота в значительной мере зависят от плотности культуры и интенсивности перемешивания суспензии. В многочисленных публикациях экспериментально показано, что как мерцание, так и спектральный состав потока излучения могут оказывать существенное влияние на микроводоросли [4-6], поэтому для полноты описания световых условий эксперимента наряду с интенсивностью светового потока необходимо указывать спектральный состав и распределение светового потока на поверхности.

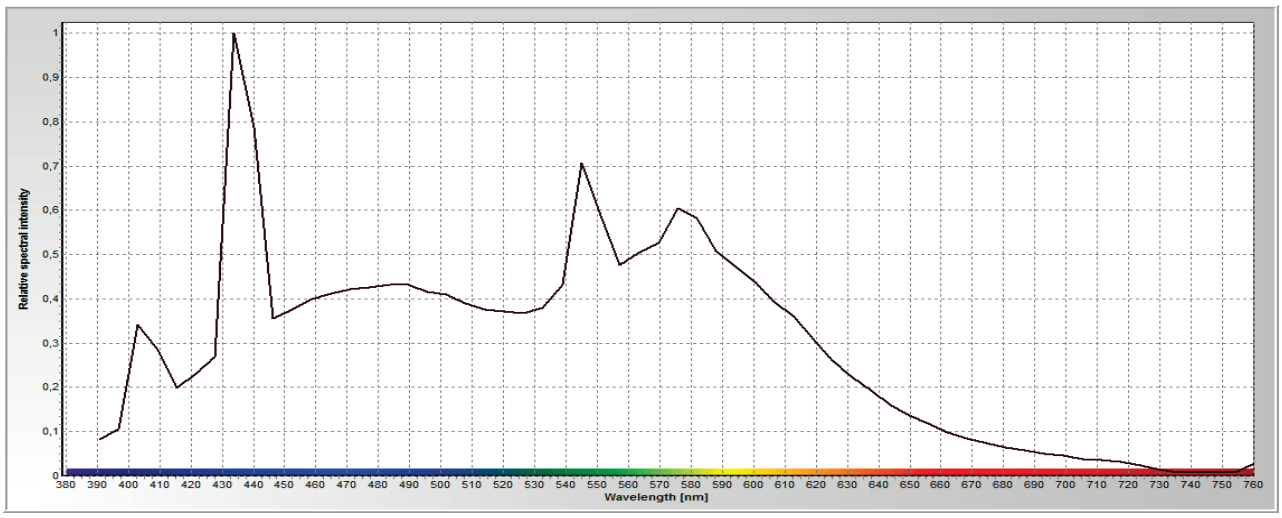
Цель данной работы – с помощью компьютерного моделирования показать распределение светового потока на рабочей поверхности фотобиореактора при использовании различных источников излучения для интенсивного культивирования микроводорослей.

Моделирование распределение светового потока на поверхности культиватора от осветительных установок было выполнено в программе для проектирования освещения DIALux, разработанной немецкой компанией DIAL GmbH и предназначенной для выполнения светотехнических расчетов и проектирования как внутреннего, так и внешнего освещения, которая распространяется бесплатно.

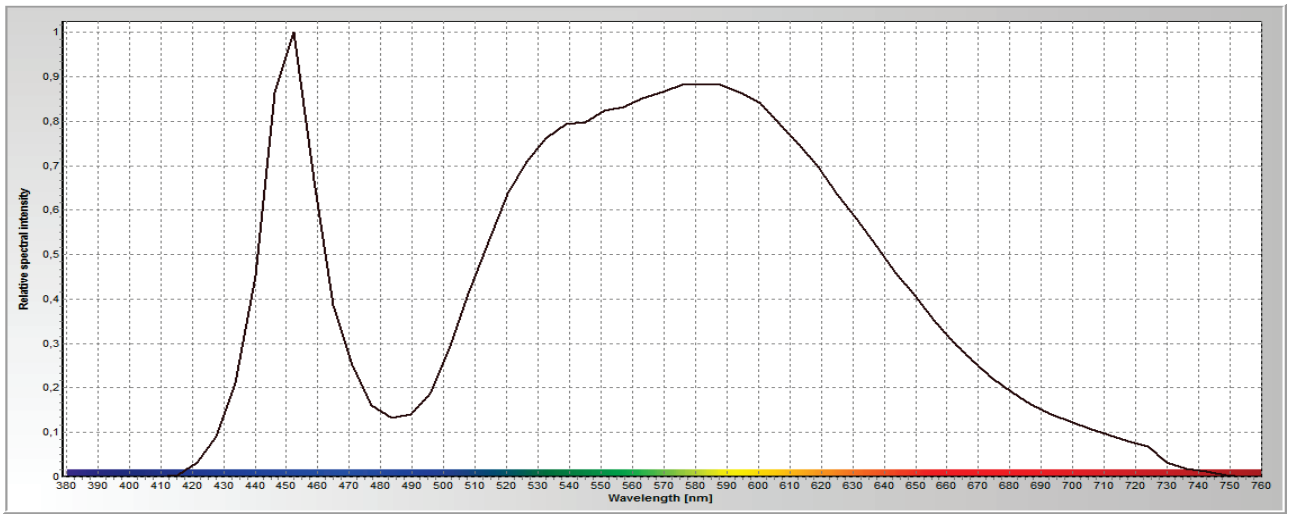
На рисунке 2 представлен фотобиореактор с осветительной установкой, в которой в качестве источника излучения используются люминесцентные лампы дневного белого света Philips TL-D 18W/54-765 в количестве 10 шт. В данном случае по результатам моделирования видно, что освещенность в точках на поверхности фотобиореактора существенно отличается. Минимальная освещенность 1025 лк, максимальная 4793 лк, при этом средняя равна 3297 лк. Периодически такие лампы выходят из строя, одна или несколько ламп в осветительной установке со временем перестают давать первоначальный световой поток или полностью перестают светить, но исследователи могут не придать этому должного значения, так как внешне это кажется не критичным. На рисунке 3 показан фотобиореактор с осветительной установкой, в которой в качестве источника излучения используются такие же люминесцентные лампы дневного белого света, только уже в количестве 6 шт. По изолиниям и фиктивным цветам на рисунке можно сделать вывод, что в данном случае распределение освещенности не такое равномерное, как при 10-ти лампах.



а) Спектр излучения люминесцентных ламп Philips TL-D 18W/54-765

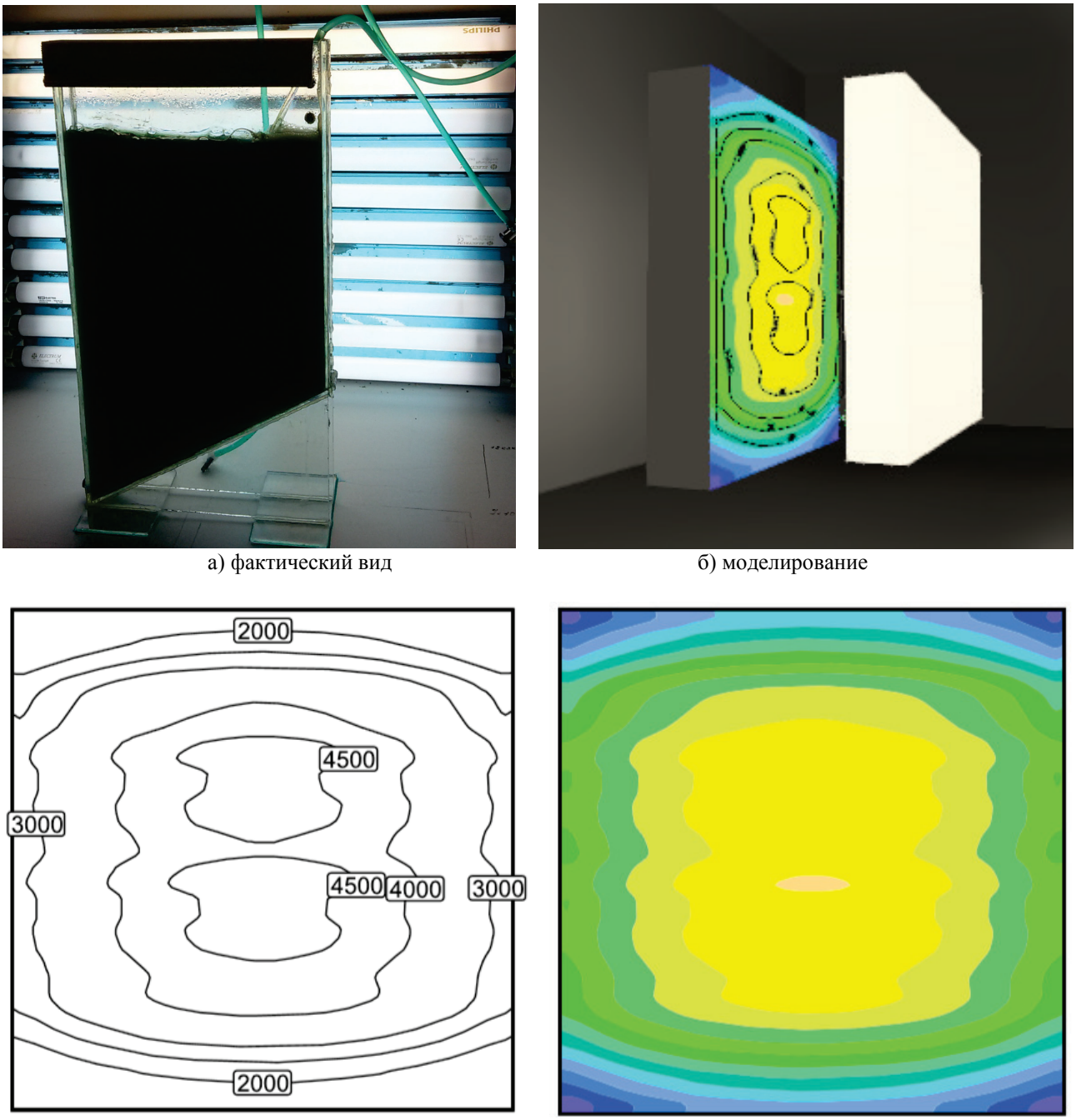


б) Спектр излучения лампы Лисма ДРЛ 700



в) Спектр излучения светодиодов в осветительной установке НИИПП Томск

Рисунок 1. Спектры излучения 3-х источников белого света, используемых при культивировании микроводорослей, полученные с помощью спектроколориметра ТКА-ВД/02 и программного обеспечения "Спектрофотометр"



а) фактический вид

б) моделирование

в) изолинии на поверхности, лк

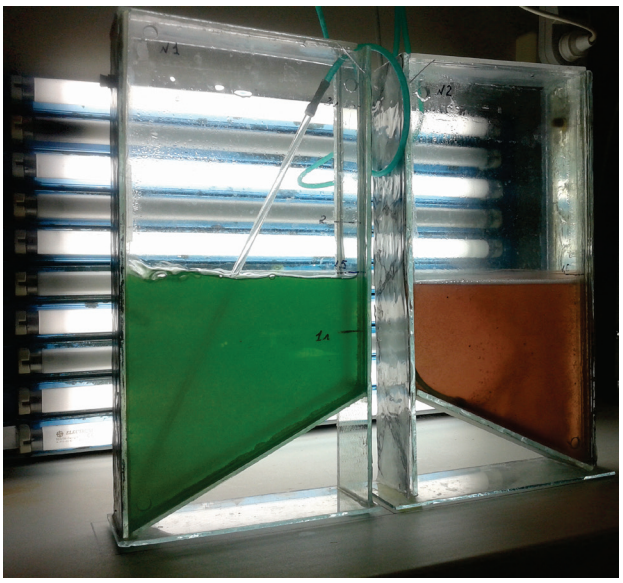
г) фиктивные цвета на поверхности, лк

Рисунок 2. Фотобиореактор с люминесцентными лампами дневного света в кол-ве 10 шт

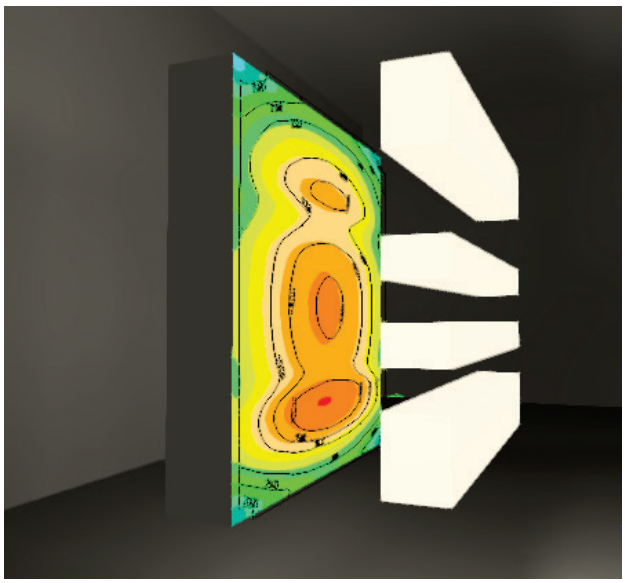
На рисунке 4 приведен пример, когда в качестве источника излучения используется лампа разрядная ртутная высокого давления Лисма ДРЛ 700, расположенная сбоку от фотобиореактора. Результаты моделирования показывают, что разброс освещенности в разных точках поверхности особенно велик, от 4 до 15 клк. На практике при прямых измерениях люксметром на поверхности фотобиореактора с подобным расположением источника излучения разница в освещенности доходила до 10 раз.

В другом варианте расположения такой же лампы (рис. 5), когда освещаемая поверхность емкости с суспензией находится прямо под лампой, распределение освещенности более равномерное. При подвесе на высоте 40 см минимум освещенности составляет 11227 лк, максимум 27441 лк. Картина распределения освещенности напрямую зависит от расположения источника излучения относительно рабочей поверхности фотобиореактора.

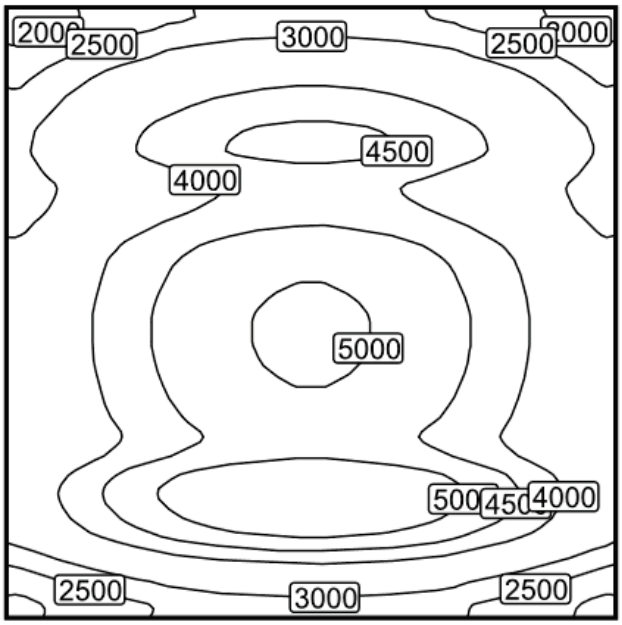
Наиболее равномерная освещенность при моделировании представлена на рисунке 6. Такой результат удалось получить, используя осветительную установку на базе светодиодов, которая была собрана в Научно-исследовательском институте полупроводниковых приборов (НИИПП) г. Томск. Равноудаленное друг от друга расположение излучающих элементов по всей площади светильника (светодиодная панель) позволило получить такое распределение света на поверхности фотобиореактора.



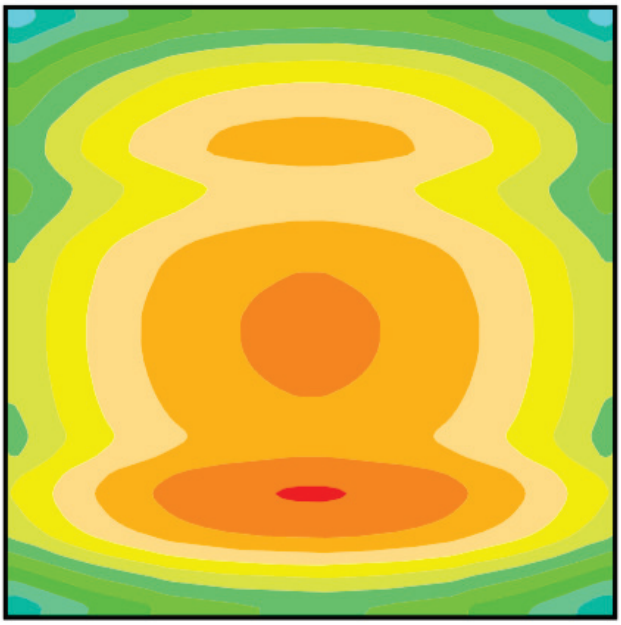
а) фактический вид



б) моделирование



в) изолинии на поверхности, лк

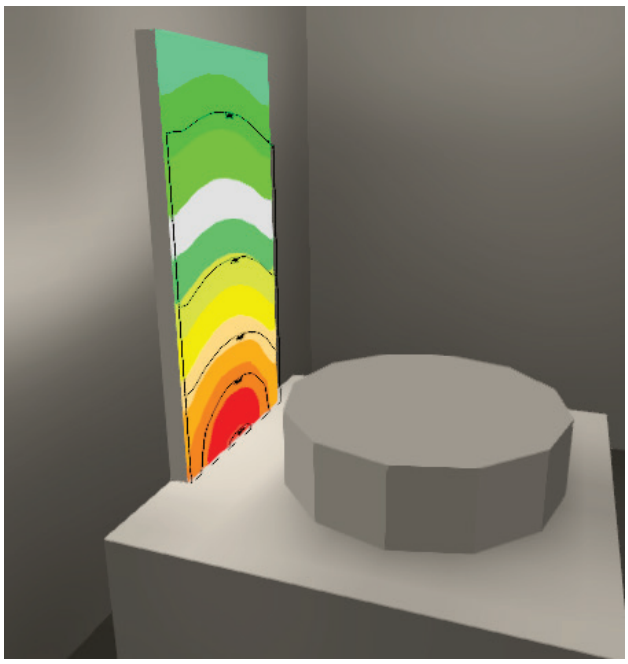


г) фиктивные цвета на поверхности, лк

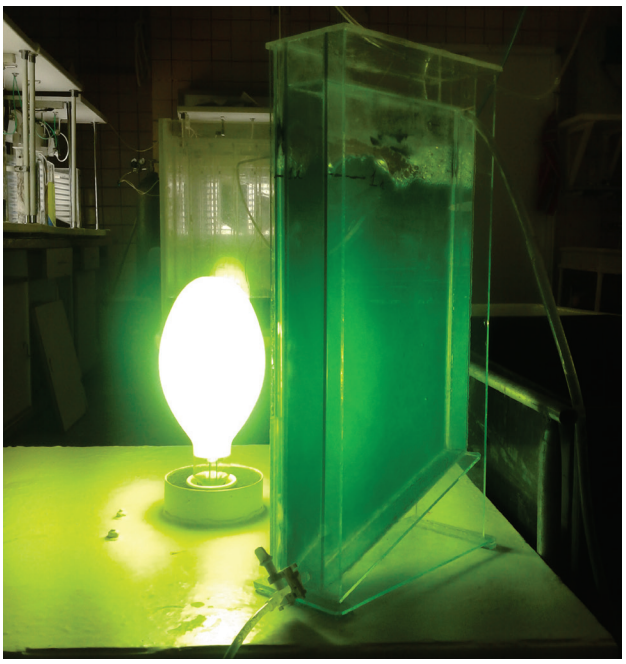
Рисунок 3. Фотобиореактор с люминесцентными лампами дневного света в количестве 6 шт

Таким образом, при проведении исследований и сравнении результатов становится ясно, что при отличном друг от друга расположении светильников будет разное распределение света по рабочей поверхности фотобиореактора, что создает разные условия режима свет-темнота для клеток в эксперименте. А разные по спектру источники излучения соответственно оказывают разное влияние на физиологические процессы в клетках.

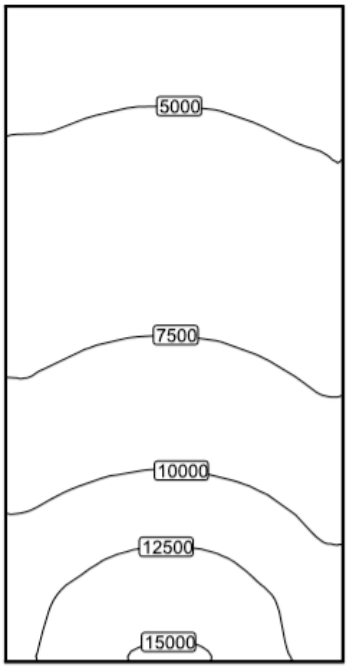
Исходя из вышесказанного, для корректного сравнения результатов исследований по культивированию микроводорослей, рекомендуется более полно описывать световые условия культивирования в проведении экспериментов (тип лампы, спектральный состав, освещенность (облученность) на рабочей поверхности и распределение светового потока на рабочей поверхности фотобиореактора. Чтобы создать равномерное распределение светового потока не рекомендуется использовать точечные источники излучения (например, лампа ДРЛ), а рекомендуется использовать светодиодные панели.



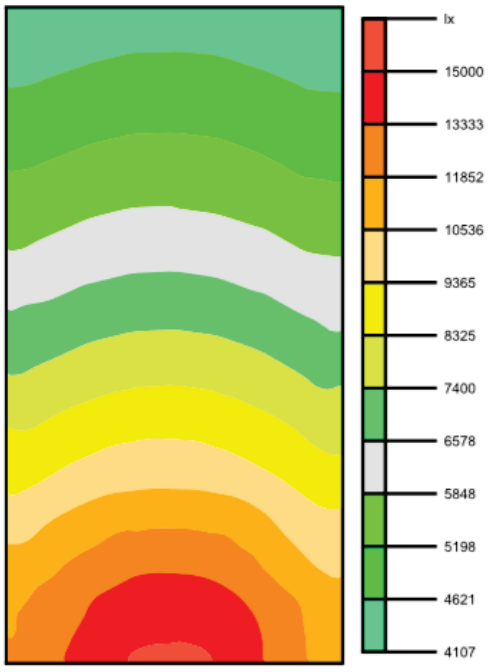
а) фактический вид



б) моделирование



в) изолинии на поверхности, лк

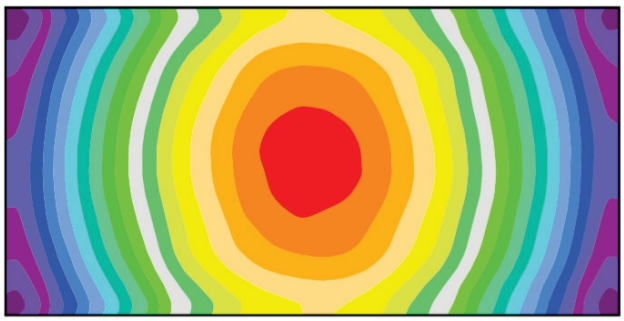


г) фиктивные цвета на поверхности, лк

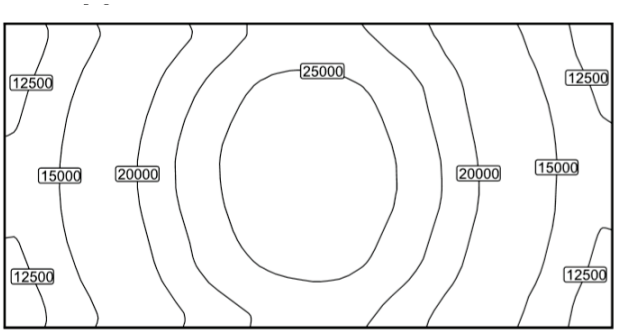
Рисунок 4. Фотобиореактор с лампой Лисма ДРЛ 700 сбоку



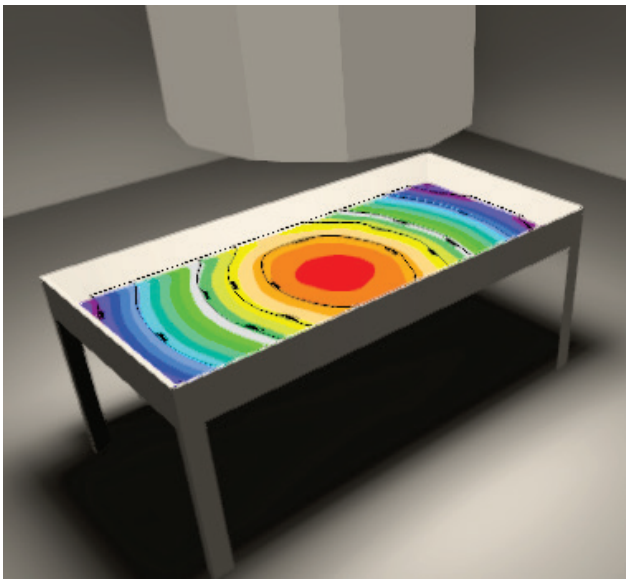
а) фактический вид



б) моделирование

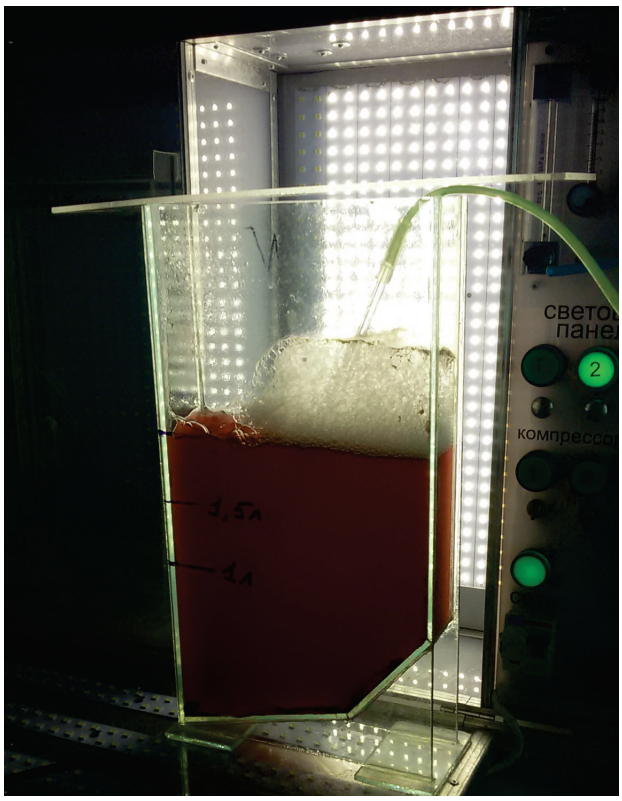


в) изолинии на поверхности, лк

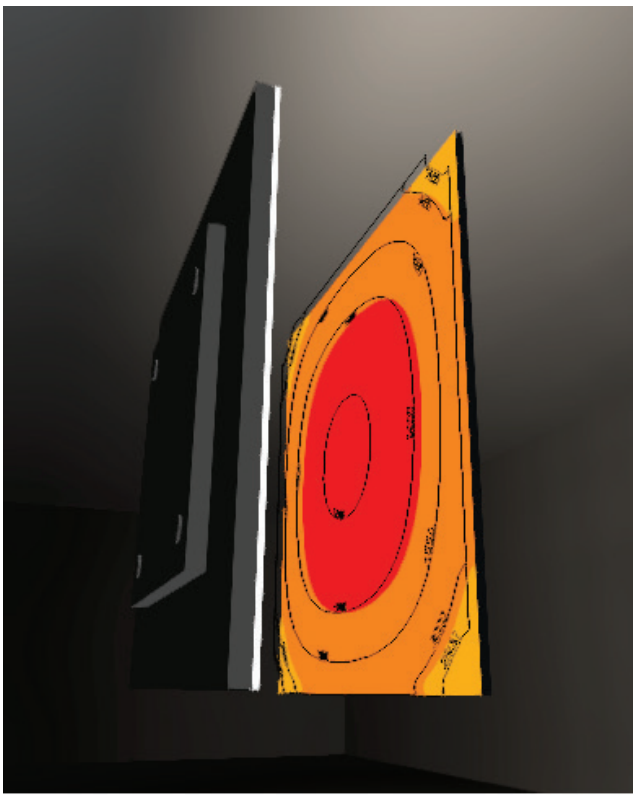


г) фиктивные цвета на поверхности, лк

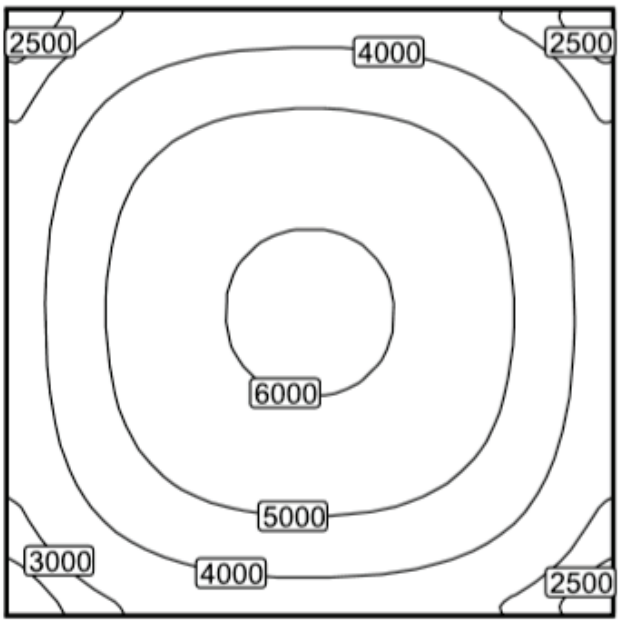
Рисунок 5. Фотобиореактор с лампой Лисма ДРЛ 700 сверху



а) фактический вид



б) моделирование



в) изолинии на поверхности, лк



г) фиктивные цвета на поверхности, лк

Рисунок 6. Фотобиореактор со светодиодной панелью

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИМБИ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ госрегистрации АААА-А18-118021350003-6) и при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00672.

Список литературы / References:

1. Рабинович Е.И. *Фотосинтез* / Пер. с англ. Ильина А.А., Бояркин А.Н.; Ред. Ничипорович А.А., Шпольский Э.В. М.: ИЛ, 1953, т. 2, 653 с. [Rabinovich Ye.I. *Photosynthesis* / Translat. from English Il'ina A.A., Boyarkin A.N.; Red. Nichiporovich A.A., Shpol'skiy E.V. Moscow: IL, 1953, vol. 2, 653 p. (In Russ.)]

2. Стадничук И.Н. *Фикобилипротеины. Биологическая химия* (Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР). М., 1990, т. 40, 196 с. [Stadnichuk I.N. *Phycobiliproteins. Biological chemistry* (Itogi nauki i tekhniki VINITI AN SSSR). Moscow, 1990, vol. 40, 196 p. (In Russ.)]

3. Козел Н.В., Доманский В.П., Мананкина Е.Е., Адамчик К.О. [и др.] Влияние спектрального состава светодиодного излучения на структуру фотосинтетического аппарата *Spirulina platensis*. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі*, 2015, № 2, с. 44-49. [Kozel N.V. Domansky V.P., Manankina E.E., Adamczyk K.O. [et al.] The effect of the spectral composition of the led emission on the structure of the Spirulina platensis photosynthetic apparatus. *Vesci Nacyyanal'naj akadehmii navuk Belarusi*, 2015, no. 2, pp. 44-49. (In Russ.)]

4. Nedbal L., Tichy V., Xiong F., Grobbelaar J.U. Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *Journal of Applied Phycology*, 1996, vol. 8, pp. 325-333.

5. Abu-Ghosh S., Fixler D., Dubinsky Z., Iluz D. Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology*, 2016, vol. 203, pp. 357-363.

6. Мальцевская Н.В. *Энергосберегающие режимы освещения при культивировании светозависимых микроорганизмов*: автореф. дисс. … канд. биол. наук, Москва, 2012, 18 с. [Mal'tsevskaya N.V. *Energy-saving lighting modes in the cultivation of light-dependent microorganisms*: thesis abstract PhD, Moscow, 2012, 18 p. (In Russ.)]

MODELING OF LIGHT DISTRIBUTION ON THE WORKING SURFACE OF THE PHOTOBIOREACTOR FOR MICROALGAE

Malakhov A.S.[1], Gevorgiz R.G.[2], Zheleznova S.N.[2]

[1] National research Tomsk Polytechnic University

Lenin av., 30, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: mac5989@mail.ru

[2] Institute of Marine Biological Research A.O. Kovalevsky

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru, zheleznovasveta@yandex.ru

Abstract. The results of the light engineering modeling of the light flux distribution on the working surface of a photobioreactor for the most frequently used radiation sources in the cultivation of microalgae are presented. the results show how the illuminance at different points on the surface of the photobioreactor differs significantly, which changes the conditions of light-darkness. It is also shown that despite the external similarity of the emitted light from different radiation sources, their spectral compositions are not identical. This all has a significant effect on the biosynthesis in microalgae. Recommendations are given on the description of light conditions in studies of intensive microalgae cultures. It is noted that for the uniform light flux distribution on the photobioreactor working surface, it is necessary to use LED panels. It is not recommended to use point sources of radiation, for example, mercury arc lamps, as the radiation source.

Key words: *light flow, LED, fluorescent lamp, mercury arc lamp.*

POISSON'S RATIO OF DENTIN AND ENAMEL AS ANISOTROPIC MEDIA WITH HEXAGONAL SYMMETRY

Muslov S.A.
Evdokimov Moscow State Medical Stomatological University (MSMSU)
Delegatskaya St. 20-1, 127473, Moscow, Russia; e-mail: muslov@mail.ru
Received: 04.07.2018.

Abstract. In this paper, the orientation dependence of the Poisson's ratio of teeth's dentin and enamel on the basis of matrices of elastic constants and the compliance coefficients of hexagonal crystals, such as crystals of dentine hydroxyapatite, was obtained for the first time. The results of calculating the Poisson's ratios of dentin and enamel as a crystalline system with a hexagonal structure are presented in the form of tables and diagrams in the polar and Cartesian coordinate systems. It is shown that the maximum value of the Poisson's ratio of dentin (0.54) is greater than the upper limit for the Poisson's ratio of isotropic materials, including known restoration materials, which in some cases may reduce the quality of restorations. The effective elastic characteristics of dentine and enamel, including Poisson's ratio using different averaging methods, are calculated.
***Key words**: enamel, dentin, Poisson's ratio, crystals of hydroxyapatite.*

INTRODUCTION

Elastic properties of hard tissues of tooth and hydroxyapatite, as their mineral component, quite often cause interest among researchers [1-8]. However, a number of aspects of this subject, in particular the value of the Poisson's ratio (coefficient of transverse deformation) of dentine and enamel as anisotropic media with hexagonal symmetry, remain relevant to the end. The study was conducted on the basis of two different methods of calculation [9, 10].

According to modern concepts, the range of possible values of the Poisson's ratio [11, 12] can be negative $\mu<0$ (auxetics), and more than 0.5. For dentin and enamel the "technical" coefficient according to the literature data lies in the range of 0.29-0.33 [13], for example, according to the results of ultrasonic measurements for dentin, it is equal to 0.32, in enamel – 0.28 [8].

THE STUDY OF ANISOTROPY POISSON RATIO OF DENTIN AND ENAMEL

It is believed that dentin is a biocomposite and consists of approximately 45-70 % of inorganic material [7, 14] in the form of hydroxyapatite crystals. Crystals of hydroxyapatite are located between the collagen fibers and the class of symmetry belong to hexagonal crystal structure. The mineral base of enamel is represented by hexagonal crystals of hydroxide, carbonate, chlorine, fluorapatite, and enamel prisms are the main structural formation. Therefore, there is every reason to consider dentine and enamel as anisotropic media, which means that their elastic properties are described by the matrix of elastic constants c_{ij} or compliance coefficients s_{ij} .

The Poisson ratios of such a medium in the general form can be defined as

$$\mu_{kl} = -\frac{\varepsilon_{ll}}{\varepsilon_{kk}}, \tag{1}$$

where ε_{kl} – components of the strain tensor. As a result, hexagonal systems, dentin and enamel are also described by two Poisson's ratios μ'_{31} and μ'_{32} [10]. According to the literature data, the values of the elastic constants of dentin and enamel are well known [5, 6], so knowing them, we can calculate the coefficients of compliance and the Poisson's ratio of dentin and enamel by the corresponding formulas [10, 15] for hexagonal crystals.

$$\begin{gathered} c_{11}+c_{12}=\frac{s_{33}}{s},\quad c_{11}-c_{12}=\frac{1}{s_{11}-s_{12}},\quad c_{13}=-\frac{s_{13}}{s} \\ c_{33}=\frac{s_{11}+s_{12}}{s},\quad c_{44}=\frac{1}{s_{44}},\quad c_{66}=\frac{1}{s_{66}},\quad s=s_{33}(s_{11}+s_{12})-2s_{13}^2\ , \end{gathered} \tag{2}$$

$$\mu'_{31}=-[\sin^2\psi\sin^2\theta\cos^2\theta(s_{11}+s_{33}-s_{44})+(\cos^2\theta-\sin^2\theta\cos2\theta\sin^2\psi)s_{13}+\sin^2\theta\cos^2\psi s_{12}]/s'_{33} \tag{3}$$

and

$$\mu'_{32}=-[\cos^2\psi\sin^2\theta\cos^2\theta(s_{11}+s_{33}-s_{44})+(\cos^2\theta-\sin^2\theta\cos2\theta\cos^2\psi)s_{13}+\sin^2\theta\sin^2\psi s_{12}]/s'_{33}, \tag{4}$$

where

$$s'_{33}=\cos^4\theta s_{33}+\sin^2\theta\cos^2\theta(2s_{13}+s_{44})+\sin^4\theta s_{11}\ , \tag{5}$$

Table 1. Elastic constants of dentin and enamel (GPa)

Material	c_{11}	c_{12}	c_{13}	c_{33}	c_{44}
Dentin	37.00	16.60	8.70	39.00	5.70
Enamel	115.00	42.40	30.00	125.00	22.80

Table 2. Compliance coefficients of dentin and enamel (GPa^{-1})

Material	s_{11}	s_{12}	s_{13}	s_{33}	s_{44}
Dentin	0.0346	-0.0145	-0.0045	0.0276	0.1754
Enamel	0.0104	-0.0034	-0.0017	0.0088	0.0439

θ и ψ – Eulerian angles (describing the rotation of an absolutely rigid body in a three-dimensional Euclidean space). Orthogonal system x_i has the Ox_3 axis parallel to the <c>-axis of the crystal.

Equation (4) gives Poisson's ratio for an extension along $Ox_3^{'}$ and a contraction along $Ox_2^{'}$, equation (3) gives Poisson's ratio for a contraction in the perpendicular direction $Ox_1^{'}$.

For an isotropic solid $s_{11} = s_{22} = s_{33}$, $s_{44} = s_{55} = s_{66} = 2(s_{11} - s_{12})$, $s_{12} = s_{13} = s_{23}$ and equation (3), (4) and (5) are reduced to $s_{33}^{'} = s_{11}$, $\mu_{32}^{'} = \mu_{31}^{'} = -s_{12} / s_{11}$, so that Poisson's ratio is independent of orientation, what we wanted to prove.

Values of elastic constants c_{ij} and compliance coefficients s_{ij} of dentin and enamel are presented in Table 1 and 2.

The results of calculating the Poisson coefficients (directional dependence) of the dentin and enamel as crystal systems with a hexagonal structure are shown in Figure 1 and Figure 2.

Worthy of attention approach based on calculation of extreme values of the Poisson ratio of crystalline media and create isosurfaces of the coefficient in space [9, 16]. The results of calculating the coefficients of the dentin and enamel Poisson as a crystal hexagonal structure are presented in Table 3 and Figure 3.

All graphics (Figure 1-3) clearly show the pronounced anisotropic behavior of the Poisson's ratio of dentin and enamel crystals. Its values, depending on the direction in space, vary within a very wide range (4.15 times in dentin and 2.94 times in enamel). This number of times can be called the anisotropy coefficient for the Poisson ratio.

Note the anomaly high value of the maximum value of the Poisson's ratio (0.534-0.54) along a number of directions, which is extremely unusual for materials. This means that the compression of the local areas of the dentin along these directions will increase their volume, and when stretched – on the contrary, decrease. The elastic behavior under load of the restoration material is fundamentally different (Poisson's ratio of the filling material is significantly less than 0.5, for example, according to [17] it is between the values of 0.24 to 0.35 for dental composite materials), so its volume decreases when compressed and increases when stretched. This discrepancy in the deformation behavior at the boundary of heterogeneous media of the filling material and dentin can lead to the formation of overstress domains at this boundary, to the weakening of adhesion of the restoration material with dentin and, as a negative result, the degradation of fixation and the often encountered situation of destruction of direct and sometimes indirect restoration, especially composite materials.

1. The average of the Poisson's ratio of dentine and enamel.

The average value of the Poisson's ratio of dentine and enamel can be obtained by applying the formulas (3-5) and the expression [10]:

$$< \mu_{ij}^{'} >= \frac{1}{2\pi} \int_0^{\pi} \int_0^{\pi} \mu_{ij}^{'}(\theta, \psi) \sin\theta d\theta d\psi \,. \qquad (6)$$

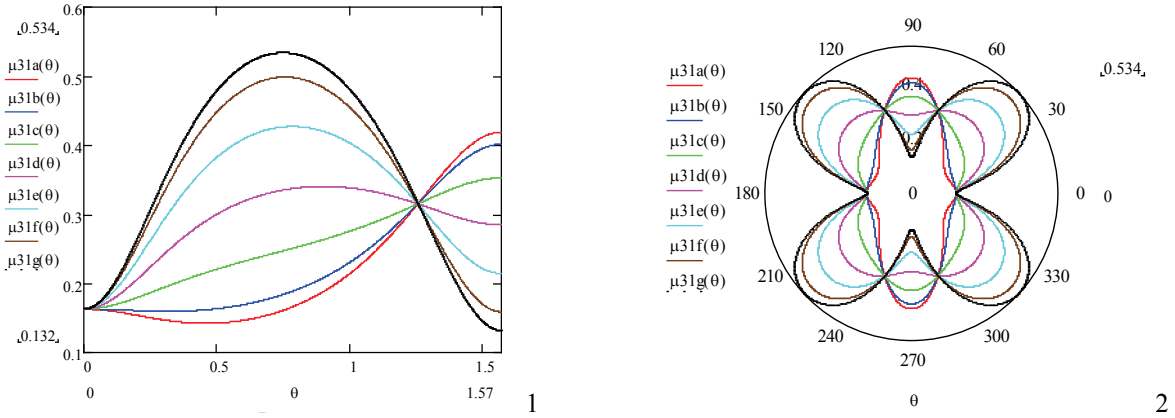
Numerical calculations of this integral in Mathcad software give the results: 0.312 for dentine and 0.286 for enamel, which is very well consistent with the data of ultrasonic measurements [8].

Table. 3. Extreme values of Poisson's ratio (μ_{min}, μ_{max}) for dentine and enamel, values of Poisson's ratio in particular orientations and "anisotropy coefficient" μ_{max} / μ_{min}

Material	μ_{max}	μ_{min}	$\mu_{[2\bar{1}\bar{1}0],[0001]}$	$\mu_{[01\bar{1}0],[2\bar{1}\bar{1}0]}$	$\mu_{[0001],[2\bar{1}\bar{1}0]}$	μ_{max} / μ_{min}
Dentin	0.54	0.13	0.16	0.13	0.42	4.15
Enamel	0.47	0.16	0.19	0.16	0.33	2.94

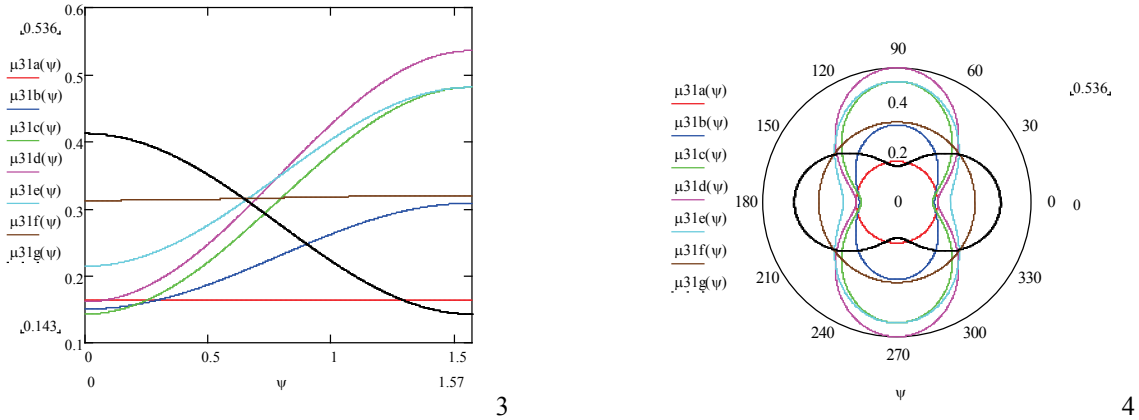
Cartesian coordinates

Polar coordinates



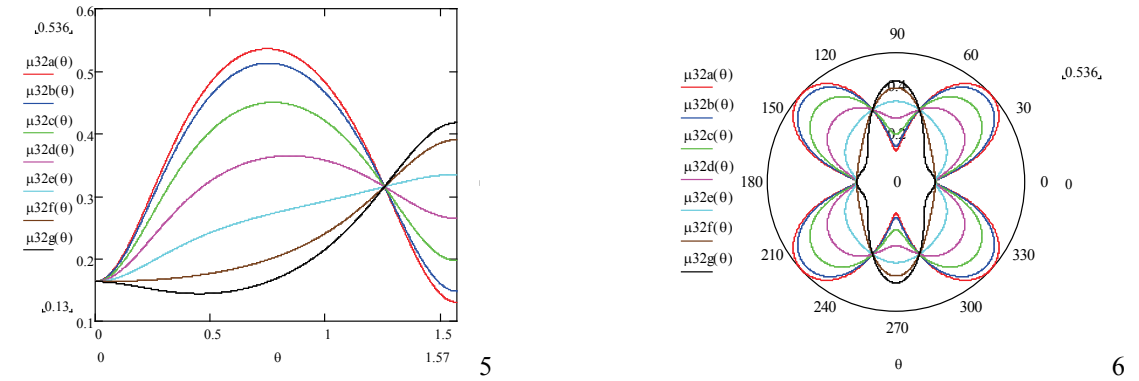
1 2

$\mu'_{31}(\theta)$ (a-g: $\psi = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)



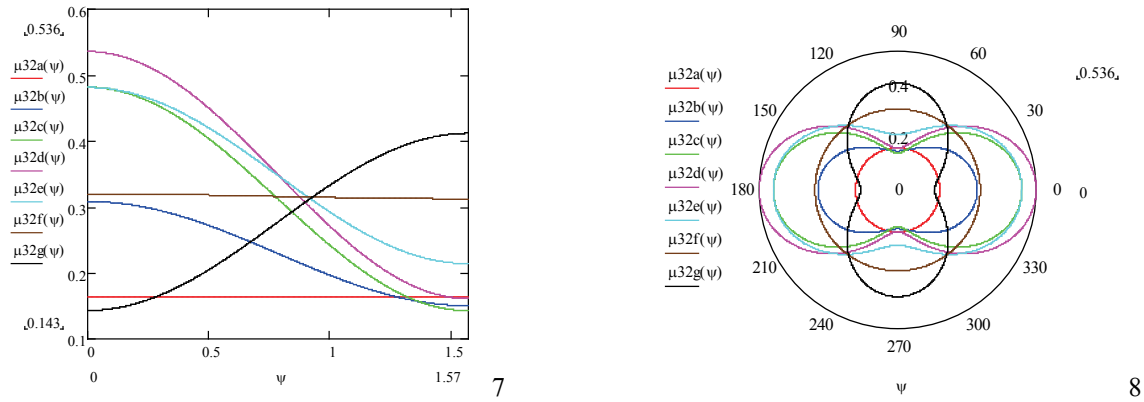
3 4

$\mu'_{31}(\psi)$ (a-g: $\theta = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)



5 6

$\mu'_{32}(\theta)$ (a-g: $\psi = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)

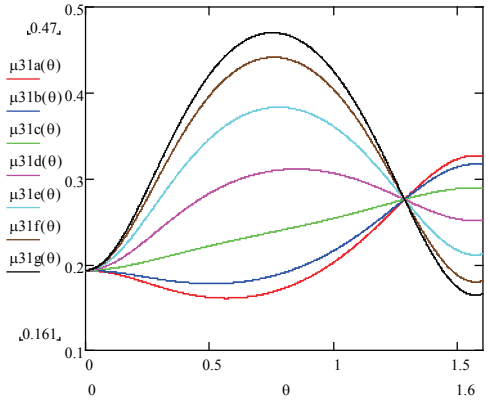


7 8

$\mu'_{32}(\psi)$ (a-g: $\theta = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)

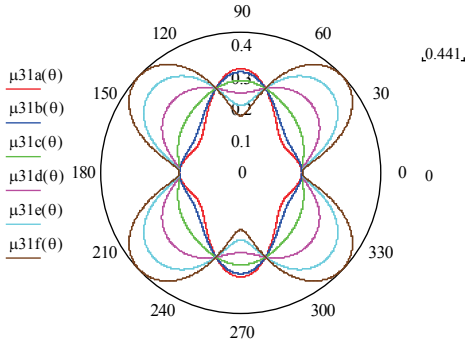
Figure 1. The Poisson's ratio μ'_{31} (1-4) and μ'_{32} (5-8) of dentin for different directions θ and ψ

Cartesian coordinates



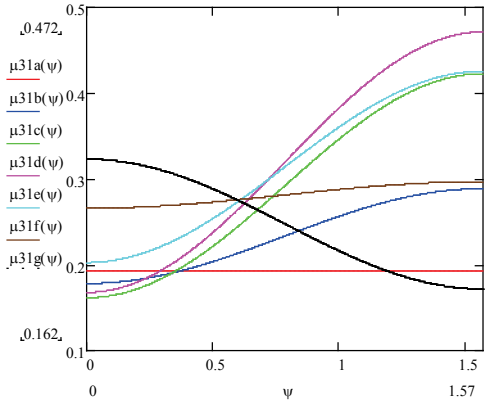
1

Polar coordinates

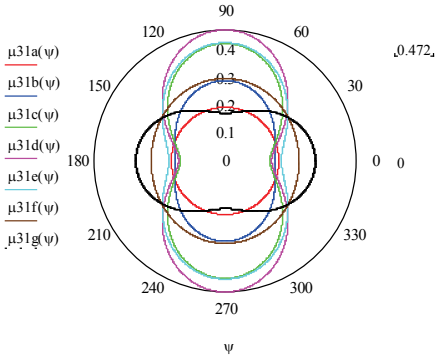


2

$\mu'_{31}(\theta)$ (a-g: $\psi = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)

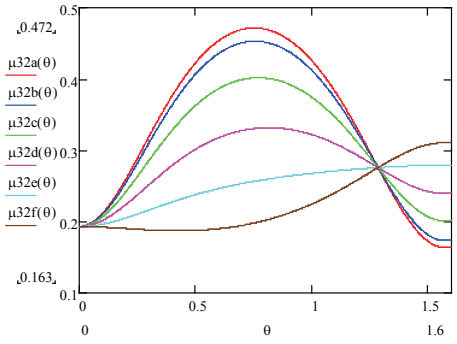


3

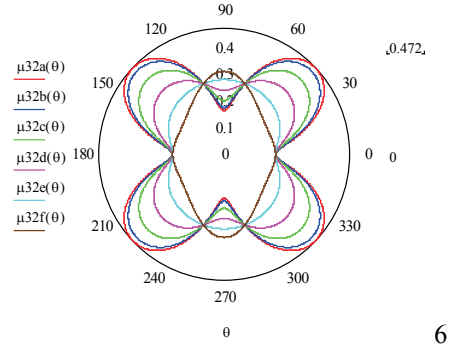


4

$\mu'_{31}(\psi)$ (a-g: $\theta = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)

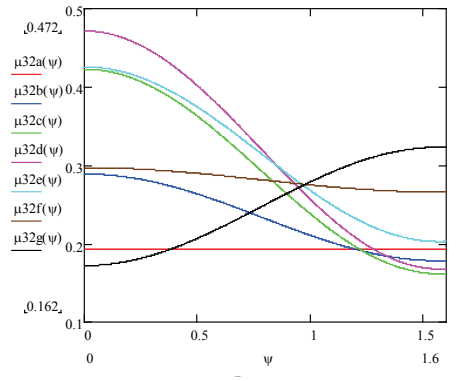


5

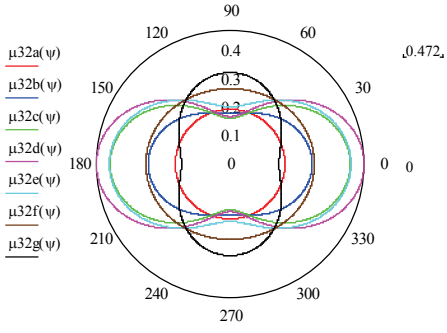


6

$\mu'_{32}(\theta)$ (a-g: $\psi = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)



7



8

$\mu'_{32}(\psi)$ (a-g: $\theta = 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5$)

Figure 2. The Poisson's ratio μ'_{31} (1-4) and μ'_{32} (5-8) of enamel for different directions θ and ψ

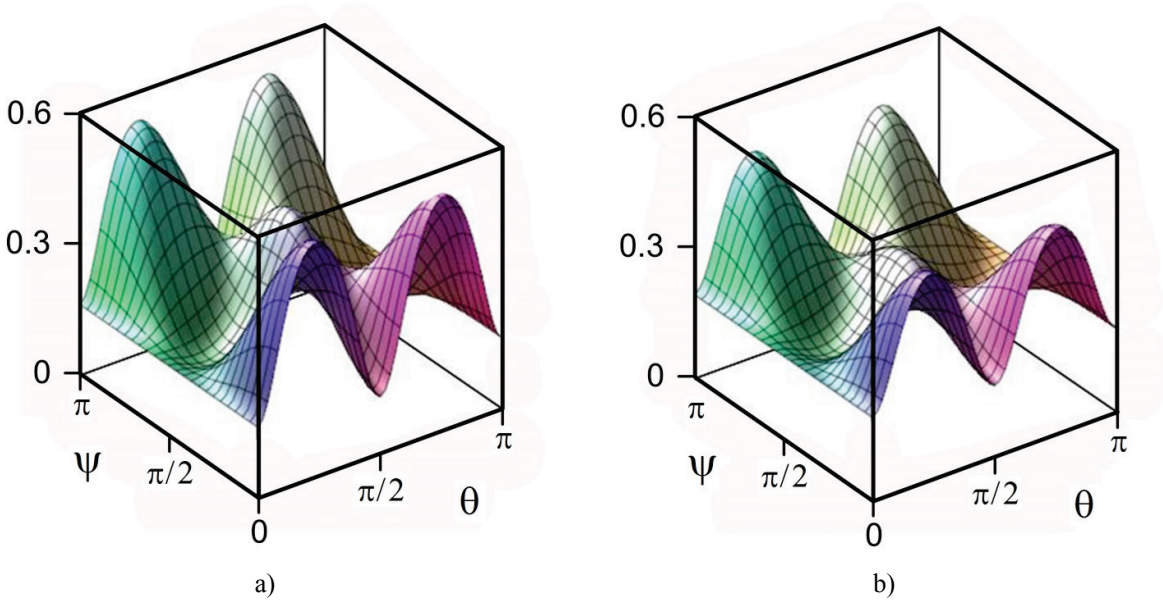


Figure 3. Variability of the Poisson's ratio of dentin (a) and enamel (b) in space

2. Calculation of the effective value of the Poisson's ratio of dentine and enamel on the basis of their elastic constants and compliance coefficients.

On the basis of data obtained on single crystals we can predict the elastic properties of dentin and enamel as microinhomogeneous materials [18].

According to the Voigt averaging, the module of all-round compression and the shear modulus for hexagonal crystals are equal respectively

$$K_V = \frac{2c_{11} + c_{33} + 2(c_{12} + 2c_{13})}{9}$$
$$G_V = \frac{7c_{11} + 2c_{33} - 5c_{12} - 4c_{13} + 12c_{44}}{30}. \quad (7)$$

In the approach proposed by Reuss, the averaging of the compliance tensors is performed, as a result of which for the hexagonal lattice we obtain

$$\frac{1}{K_R} = 2s_{11} + s_{33} + 2(s_{12} + 2s_{13})$$
$$\frac{1}{G_R} = \frac{2(7s_{11} + 2s_{33} + 3s_{44} - 5s_{12} - 42s_{13}}{15}. \quad (8)$$

In many cases, a good agreement with the experimental data gives the proposed by Hill arithmetic mean value, found by the averaging for Voigt and Reuss, namely

$$K_H = \frac{1}{2}(K_V + K_R),\ G_H = \frac{1}{2}(G_V + G_R). \quad (9)$$

Keeping in mind that two modules are independent in the isotropic approximation, we can write expressions for E_H and μ_H as functions K_H and G_H:

$$\langle E_H \rangle = \frac{9K_H G_H}{3K_H + G_H},\ < \mu_H >= \frac{3K_H - 2G_H}{6K_H + 2G_H}. \quad (10)$$

Table 4 shows the values of the averaged elastic modules and the Poisson's ratio of dentine and enamel, calculated from the values of elastic constants and compliance coefficients using the described averaging methods used for single-phase hexagonal polycrystals.

Table 4. Averaged elastic modules and Poisson's ratio of dentine and enamel

Material	K_V	G_V	K_R	G_R	K_H	G_H	E_H	μ_H
Dentin	20.11	9.59	20.03	8.21	20.07	8.90	23.26	0.31
Enamel	62.20	33.22	62.20	30.54	62.20	31.88	81.69	0.28

Note that the calculated values of μ_H are in good agreement with the known experimental data [8] and results of section 3 for $<\mu'_{ij}>$.

SUMMARY

1. Dentin and tooth enamel are not isotropic media due to the symmetry of their mineral component – hydroxyapatite crystals.

2. The expressed anisotropy of the Poisson's ratio of dentine and enamel is established on the basis of calculations by formulas of elastic constants and compliance coefficients for hexagonal symmetry. The maximum value of the Poisson's ratio of dentine (0.534-0.54) is more than 4 times (4.15) higher than the minimum (0.13).

3. The maximum value of the Poisson's ratio of dentine is higher than the upper limit for the Poisson's ratio of isotropic, including restoration materials used in dentistry, which can locally affect the quality of restorations. In this context, it is suggested that the established elastic anisotropy of the dentin model with crystal hexagonal symmetry is a clinically undesirable factor.

4. A more careful analysis of the elastic anisotropy of the hard tissues of the tooth as a mineral-organic complex and a microinhomogeneous heterophase system is possible with the involvement of the theory of anisotropic media with a crystallographic texture (despite the fact that all the prisms of minerals in the dentine and enamel have the same or similar crystal structure, they differ in the mutual orientation of the crystallographic axes). Further analysis is based on the knowledge of the spatial distribution of the crystallographic axes of individual mineral prisms.

5. The study of the anisotropy of dentine and enamel as an anisotropic inhomogeneous medium is of practical importance in the study of the strength of tooth tissues and the quality of restorations.

6. The values of the Poisson's ratio of enamel are not fundamentally different from those of dentin. They are still quite large and indicate anisotropy of elastic properties of tooth enamel, although to a lesser extent: $\mu_{max} / \mu_{min} = 2.94$.

7. Calculation of effective Poisson's ratios of hard tooth tissues based on elastic constants and compliance coefficients and different averaging methods gives results that are in good agreement with empirical data.

References:

1. Belomestnykh V.N., Tesleva E.P. Poisson's ratio and the Grüneisen parameter of solids. *Bulletin of the Tomsk Polytechnic University*, 2003, vol. 306, no. 5, pp. 8-12.

2. Goldstein R.V., Gorodtsov A., Lisovenko D.S. Variability of elastic properties of hexagonal auxetics. *DAN*, 2011, vol. 441, no. 4, pp. 468-471.

3. Ivanov G.P., Lebedev T.A. On the physical sense of the Poisson's ratio. *Proceedings of Leningr. polytechnic. in-ta named M.I. Kalinina*, 1964, vol. 236, pp. 38-46.

4. Lebedenko I.Yu., Arutyunov S.D., Muslov S.A., Useinov A.S. Nanohardness and Young's modulus of tooth enamel. *Vestnik RUDN, series Medicine*, 2009, vol. 4, pp. 637-638.

5. Lebedenko I.Yu., Arutyunov S.D., Muslov S.A., Useinov A.S. Winter Study of nanomechanical properties of tooth enamel. *Chair*, 2010, vol. 32, pp. 24-28.

6. Lebedenko I.Yu., Arutyunov S.D., Muslov S.A., Bolataev Z.B. Elastic anisotropy of the hard tissues of the tooth. *Proceedings of the Eurasian Congress of medical physics and engineering "MEDICAL PHYSICS-2010", June 21-25, 2010. Moscow State University*, 2010, vol. l, pp. 279-280.

7. Lebedenko I.Yu., Arutyunov S.D., Useinov A.S., Muslov S.A., Brandt N.N., Apresyan S.V. Study of the effect of ultralow (4.2 K) temperatures on the nanomechanical properties of tooth enamel. *Proceedings of the Eurasian Congress of medical physics and engineering "MEDICAL PHYSICS-2010", June 21-25, 2010, Moscow State University*, vol. 4, part I, pp. 323-324.

8. Nye D. *Physical properties of crystals*. M: IL, 1960, 385 p.

9. Pertsov S.S., Stureva G.M., Muslov S.A., Sinitsyn A.A., Korneev A.A., Zaitseva N.V. *The basics of biomechanics for the dentists.* M: MSMSU, 2017, 115 p.

10. Khyshiktuyev B.S., Khyshiktueva N. *Biochemistry of the oral cavity.* Chita, 2004, 84 p.

11. Goldstein R.V., Gorodtsov V.A., Komarov A.M., Lisovenko D.S. Extreme values of the shear modulus for hexagonal crystals. *Scripta Mater*., 2017, vol. 140, pp. 55-58, DOI: 10.1016/j.scriptamat.2017.07.002.

12. Katz J.L., Ukraincik K. *J. Biomech*., 1971, vol. 4, p. 221, DOI: 10.1016/0021-9290(71)90007-8.

13. Katz J.L. *J. Biomech.*, 1971, vol. 4, p. 455, DOI: 10.1016/0021-9290 (71)90064-9.

14. Lees S., Davidson C.L. The role of collagen in the elastic properties of calcified tissues *J. Biomechanics*, 1977, vol. 10, no. 8, pp. 473-86.

15. Lees S. [et al.] Anisotropy in hard dental tissues *J. Biomech.* 1972, vol. 5, no. 6, pp. 557-64.

16. Povolo F. [et al.] Poisson's ratio in zirconium single crystals. *J. Nuclear Materials* 1983, vol. 118, no. 1, pp. 78-82.

17. Sew Meng Chung [et al.] Measurement of Poisson's ratio of dental composite restorative materials. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, pp. 2455-2460.

18. Shermergor T.D. *Theory of elasticity of microinhomogeneous mediums*. Moscow, Science, 1977, 399 p.

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ МЕХАНИЗМА ТОЧЕЧНЫХ СПОНТАННЫХ МУТАЦИЙ В СТРУКТУРЕ Y-ХРОМОСОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Самченко А.А., Киселев С.С., Кондратьев М.С., Комаров В.М.
Институт биофизики клетки РАН
ул. Институтская, 3а, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: komarov_vm@mail.ru
Поступила в редакцию: 05.07.2018.

Аннотация. В работе с использованием методов сравнительной геномики проанализирована специфика распределения мононуклеотидных и смешанных треков W- и S-типа в структуре ДНК половой Y-хромосомы и в близкой к ней по размерам 22 хромосомы человека. Обнаружено, что у Y-хромосомы в ее регуляторной области наблюдается аномально высокая плотность S (G/C)-треков, состоящих из относительно коротких (до 6 пар нуклеотидов) последовательностей из G/C- (и C/G-) пар. Для 22 хромосомы небольшая избыточность таких S-треков наблюдается лишь в структуре ее кодирующих областей (экзонов). Ранее в своих исследованиях мы указывали на не тривиальную, повышенную способность G/C-пар по сравнению с A/T-парами к спонтанному изменению геометрии своего комплементарного H-связывания (из-за разных размерностей скрытого структурного полиморфизма уотсон-криковских G/C- и A/T-пар). В данном случае, выявленная большая плотность S(G/C)-треков в межгенной части Y-хромосомы указывает на возможное увеличение числа событий спонтанного нарушения комплементарности в этой области по сравнению с аналогичными событиями в аутосомной 22 хромосоме. То есть, таким способом может инициироваться аномально высокая частота точечных спонтанных мутаций Y-хромосомы по сравнению с частотой аналогичных мутаций в других хромосомах человека. Что и наблюдается экспериментально.
***Ключевые слова**: ДНК структура хромосом, доминирование S-треков, структурный полиморфизм уотсон-криковских пар, частота спонтанных мутаций.*

Как известно, биологическая функция крохотной Y-хромосомы заключается в определении мужского пола организма у подавляющего большинства млекопитающих. Размеры этой хромосомы невелики. У человека она содержит 59 миллионов пар нуклеотидов (59 Mb) и занимает лишь 1,6 % от размера всего генома (3 000 Mb). Y-хромосома состоит примерно из 76 генов, кодирующих белки, главный из которых – ген *SRY* (sexdetermining region Y). В нем отсутствуют интроны. Его единственный экзон имеет 897 п.н. В целом однако считается, что почти 95 % генов Y-хромосомы связаны с развитием мужских признаков и фертильности [1].

Как и другие хромосомы, данная хромосома подвержена определенным мутационным воздействиям и в первую очередь действию точечных спонтанных мутаций. Они оказывают существенное влияние на эволюционный характер развития организма, а также являются первопричиной возникновения некоторых патологий. В то же время в связи с отсутствием гомологов в мужском хромосомном наборе, в Y-хромосоме нет межхромосомного обмена ДНК, так характерного для мутационных процессов остальной части генома. Как следствие, из-за отсутствия рекомбинационных событий консерватизм (изолированность) является отличительной характеристикой этой небольшой хромосомы.

Тем не менее, весьма неожиданным обстоятельством оказывается наблюдаемая здесь довольно высокая скорость точечных спонтанных мутаций, которая почти в 5 раз выше таковой во всех других хромосомах [2-8]. Происхождение данного, очень важного явления, до сих пор не выяснено. Поэтому установление специфики нуклеотидной организации Y-хромосомы (вариабельности её структуры по сравнению с другими хромосомами) представляется нам крайне актуальной биофизической задачей.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Прежде, чем перейти к формулировке конкретной цели нашей работы, необходимо сделать два предварительных замечания, касающихся общего фона структурной организации геномов эукариот.

Во-первых, установлено, что основу структурно-функциональной организации хромосом различных видов организмов составляют уникальные и повторяющиеся нуклеотидные последовательности (треки) [9-12]. Доля таких последовательностей может достигать иногда 98 % всей ДНК. Хотя функции большинства из них до сих пор не определены, некоторые закономерности в статистике их встречаемости как в GC-дефицитных, так и в GC-богатых геномах про- и эукариот уже замечены [13-22]. Например, нами с использованием методов сравнительной геномики было выявлено [22], что частота встречаемости в ДНК эукариот мононуклеотидных $poly(A)_n$- и $poly(T)_n$-треков, а также смешанных олигонуклеотидных W-треков (т.е. треков из A/T- и T/A-пар) практически всегда доминирует над встречаемостью мононуклеотидных $poly(G)_n$-, $poly(C)_n$-треков и смешанных S-треков (треков из G/C- и C/G-пар) равной протяженности. Физической первопричиной такой необычной асимметрии распределения A/T- и G/C-пар в составе геномов, как было показано в этой же работе, может выступать исходно разная размерность скрытого структурного полиморфизма геометрии комплементарного спаривания A/T- и G/C-пар. Одиночные G/C-пары по сравнению с A/T-парами по причине своей высокой,

4-кратной неоднозначности геометрии уотсон-криковского спаривания оснований оказались повышенным источником спонтанного нарушения регулярной геометрии Н-связывания комплементарных нуклеотидных цепей. Вполне вероятно, что именно по этой причине содержание G/C-пар в составе геномов живых организмов оказывается важнейшим критическим фактором. GC-состав ДНК, по-видимому, сильно «минимизирован» природой для сохранения стабильности воспроизведения уникальной геометрии комплементарного спаривания азотистых оснований, для обеспечения бóльшей надежности протекания генетических процессов и, в особенности, такого важного процесса, как репликация ДНК.

Во-вторых, как показывают многочисленные генетические и биохимические исследования, возникающие в хромосомах мутации неравномерно локализуются по всему геному. В некоторых сайтах происходит гораздо больше мутаций, чем следует ожидать при их случайном распределении. Такие сайты называют *горячими точками*. Природа этих горячих точек в настоящее время не совсем ясна. Но если рассматривать мутационные сайты (*под сайтом в данном случае рассматривается одна пара оснований*) внутри определенной последовательности ДНК, то возникает естественный вопрос: все ли пары оснований в одинаковой степени чувствительны к изменениям в ее структуре или некоторые из них просто мутируют с большей частотой, чем другие?

В этом отношении показательны найденные закономерности. Так, плотность появления горячих точек оказалась хорошо коррелирующей с GC-составом и числом повторов в гене. В случае с наиболее распространенным спонтанным нарушением ДНК в ходе репликации и репарации – к потере оснований и их дезаминированию - особенно чувствительными оказываются почему-то цитозиновые остатки. Кроме того, обнаружилось, что спонтанно мутируют по типу транзиций главным образом гены, имеющие в своей структуре большой процент динуклеотидов CG [4, 23-26].

Все эти обстоятельства указывают, таким образом, на особую роль нуклеотидных последовательностей и повторов из GC-пар (в нашей терминологии - треков S(G/C)-природы) в инициации процесса спонтанного нарушения комплементарных спариваний в структуре двойной спирали ДНК.

Цель данной работы – на основе сравнения частот встречаемости треков разной природы, т.е. W(A/T)- и S(G/C)-треков, в первичной структуре ДНК определить специфику локализации «активных» в точечных заменах последовательностей из G/C-пар в двух близких по размерам хромосомах – Y-хромосоме и 22 хромосоме *Homo sapiens*. Связать найденные отличия распределения треков S(G/C) природы с наблюдаемыми характеристиками точечных спонтанных мутаций этих хромосом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ частот встречаемости мононуклеотидных (A_n, T_n, G_n, C_n) и смешанных W- и S-треков в Y-хромосоме и 22 хромосоме человека проводился по данным секвенирования геномов эукариот, взятых из базы **GenBank (**www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank; ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens). Оценивались частоты появления треков постепенно увеличивающейся длины **n** от 1 до $\mathbf{n}_{max}$, где $\mathbf{n}_{max}$ – максимальная длина нуклеотидного трека, обнаруживаемого в хромосомах. Все расчеты выполнялись на основе разработанной собственной компьютерной программы, особенности алгоритма которой описаны в [22].

Обнаружено, что в обеих хромосомах (как в целых хромосомах, так и внутри генов) частоты встречаемости мононуклеотидных (A_n и T_n) и смешанных W-треков оказались доминирующими над встречаемостью мононуклеотидных (G_n и C_n) и смешанных S-треков (рис. 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11), причём аналогичные результаты были получены ранее на полноразмерных геномах эукариот [22], (На представленных графиках из-за очень большого диапазона изменений значений частот встречаемости величины $\boldsymbol{f}$ приведены в логарифмическом масштабе, $\boldsymbol{\log f}$). В тоже время в экзонах обнаружились уже свои специфические частотные особенности. Так, согласно рисункам 3, 9 распределения всех 4 типов мононуклеотидных треков оказываются сближенными по частоте встречаемости в обеих хромосомах. При этом если у половой, Y-хромосомы наблюдается сближение частот встречаемости еще и W- и S-треков т.е. треков смешанной природы (рис. 6), то у аутосомной 22 хромосомы человека (рис. 12) мы фиксируем значительное преобладание встречаемости S-треков над W-треками. В свете сделанных выше замечаний об отличительных особенностях внутреннего структурного полиморфизма G/C-пар обнаруженное обстоятельство указывает на повышенную склонность кодирующих областей этой и, по-видимому, других аутосом к такому механизму инициирования спонтанных точечных генных мутаций.

Уместно указать на имеющиеся наблюдения по направленности спонтанных процессов нуклеотидных транзиций и трансверсий в ядерных геномах эукариот. Как ни странно, именно G/C-пары обладают повышенной (иногда в несколько раз) частотой точечных спонтанных мутаций G:C→A:T (G:C → T:A) по сравнению с A/T-парами, с их заменами A:T → G:C или A:T → C:G [7,8].

Поразительным оказался результат сравнительного анализа распространенности смешанных W- и S-треков для межгенных (регуляторных) областей этих хромосом. На общем фоне доминирования повторяющихся нуклеотидных последовательностей из A/T-пар Y-хромосома демонстрирует здесь неожиданно высокую плотность встречаемости $\boldsymbol{\rho(n)}$ S-треков (где n – длина трека) довольно короткой протяженности, до $\mathbf{n} \leq \mathbf{6}$ нуклеотидов (рис. 13). (Плотность $\boldsymbol{\rho(n)}$ определялась как отношение числа встречаемости трека длины $\boldsymbol{n}$ к общему числу нуклеотидных пар в хромосоме). По сравнению с аналогичной областью 22 хромосомы, как видно из графиков, отличия значительные!

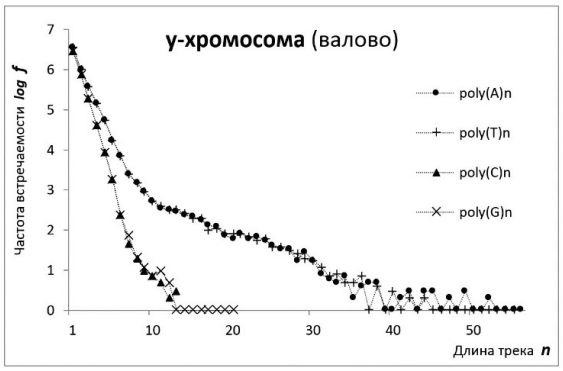


Рисунок 1. Частота встречаемости монуклеотидных треков в целой структуре Y-хромосомы

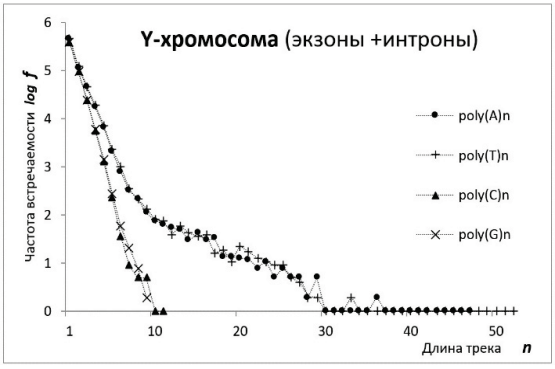


Рисунок 2. Частота встречаемости монуклеотидных треков в генах Y-хромосомы

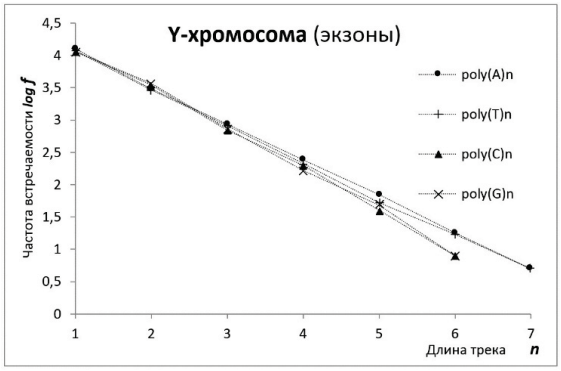


Рисунок 3. Частота встречаемости монуклеотидных треков в кодирующей части Y-хромосомы

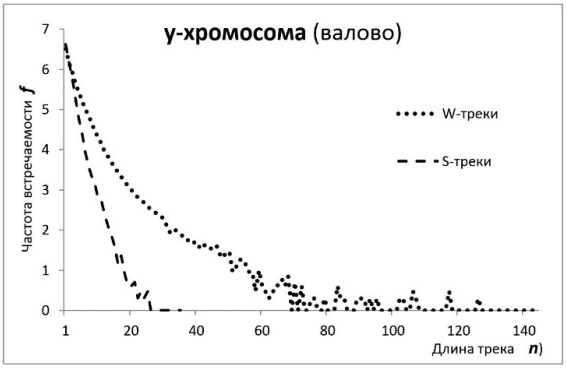


Рисунок 4. Частота встречаемости смешанных W- и S-треков в целой структуре Y-хромосомы

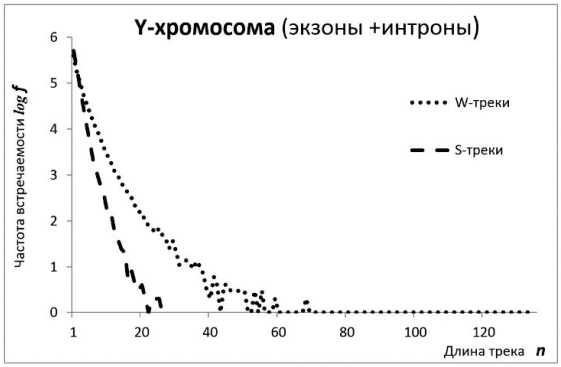


Рисунок 5. Частота встречаемости смешанных W- и S-треков в генах Y-хромосомы

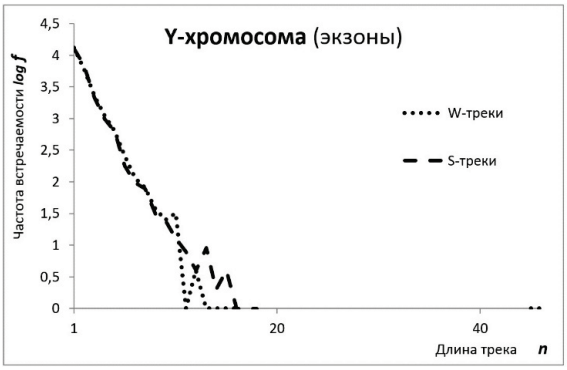


Рисунок 6. Частота встречаемости смешанных W- и S-треков в кодирующей части Y-хромосомы

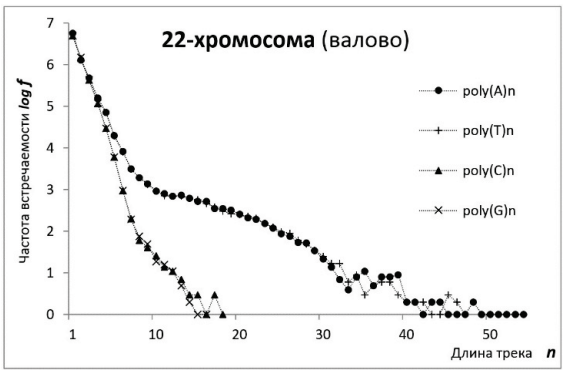


Рисунок 7. Частота встречаемости монуклеотидных треков в целой структуре 22-хромосомы

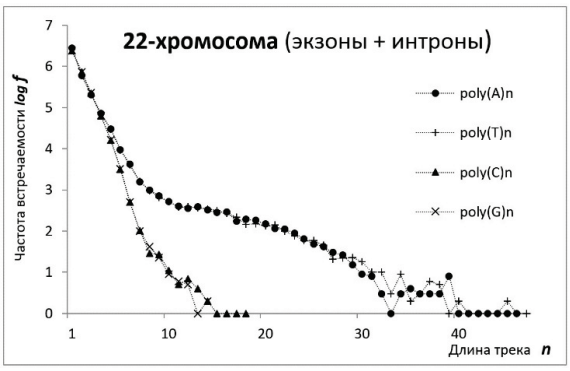


Рисунок 8. Частота встречаемости монуклеотидных треков в генах 22-хромосомы

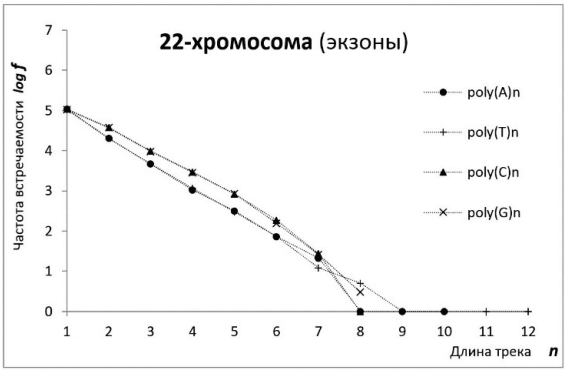


Рисунок 9 - Частота встречаемости монуклеотидных треков в кодирующей части 22-хромосомы

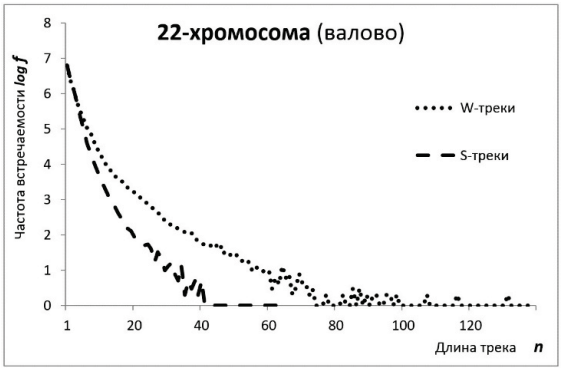


Рисунок 10 - Частота встречаемости смешанных W- и S-треков в целой структуре 22-хромосомы

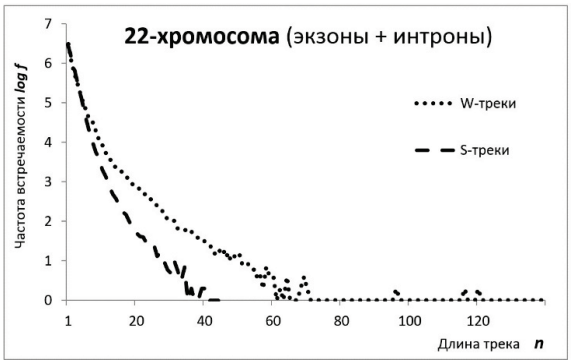


Рисунок 11. Частота встречаемости смешанных W- и S-треков в генах 22-хромосомы

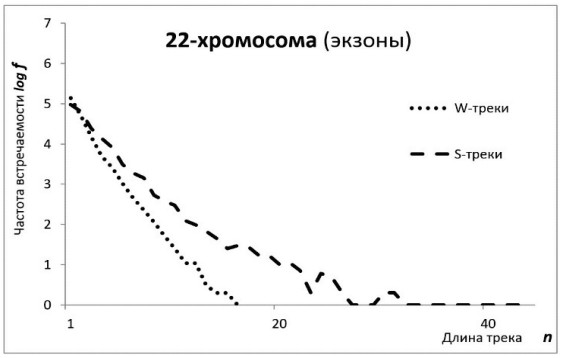


Рисунок 12. Частота встречаемости смешанных W- и S-треков в кодирующей части 22-хромосомы

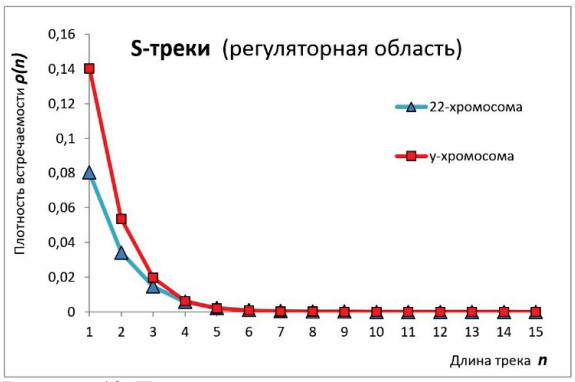


Рисунок 13. Плотность встречаемости смешанных S-треков в регуляторной области 22- и Y-хромосомы

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать вывод о важной специфике нуклеотидной организации половой Y-хромосомы. Она, по-видимому, эволюционно минимизировала кодирующие области ДНК к возникновению в них спонтанных генных патологий и при этом повысила свою общую активность к точечным мутациям за счет регуляторных участков. Это, в целом, хорошо коррелирует с имеющимися наблюдениями.

Список литературы / References:

1. Ali S., Hasnain S.E. Genomics of the human Y-chromosome-1. Association with male infertility. *Gene*, 2003, vol. 4 (321), pp. 25-37.

2. Lindblad-Toh K. [et al.] Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 2005, vol. 438, pp. 803-819.

3. Graves J.A.M. Sex Chromosome Specialization and Degeneration in Mammals. *Cell*, 2006, vol. 124 (5), pp. 901-914.

4. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002, vol. 420, pp. 520-562.

5. Wen-Hsiung Li [et al.] Male-driven evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, vol. 12, pp. 650-656.

6. Ballantyne K.N. [et al.] Mutability of Y-Chromosomal Microsatellites: Rates, Characteristics, Molecular Bases, and Forensic Implications. *The American Journal of Human Genetics*, 2010, vol. 87, pp. 341-353.

7. Lynch M., Sung W., Morris K., Coffey N., Landry C.R., Dopman E.B., Dickinson W.J., Okamoto K., Kulkarni S., Hartl D.L., Thomas W.K. A genome-wide view of the spectrum of spontaneous mutations in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, vol. 105 (27), pp. 9272-9277**.**

8. Dillon M.M., Sung W., Lynch M., Cooper V.S. The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in the GC-Rich Multichromosome Genome of Burkholderia cenocepacia. *Genetics*, 2015, vol. 200, pp. 935-946.

9. Mehrotra S., Goyal V. Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2014, vol. 12 (4), pp. 164-171.

10. Forster H., Röhl A., Lünnemann P., Brinkmann C., Zerjal T., Tyler-Smith C., Brinkmann B. A Short Tandem Repeat–Based Phylogeny for the Human Y Chromosome. *The American Journal of Human Genetics*, 2000, vol. 67 (1), pp. 182-196.

11. Jobling M.A., Tyler-Smith C. Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Science International*, 2001, vol. 118, pp. 158-162.

12. Jobling M.A., Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age". *Nature Reviews. Genetics*, 2003, vol. 4**,** pp.598-612.

13. Subirana J.A., Messeguer X. The distribution of alternating AT sequences in eukaryotic genomes suggests a role in homologous chromosome recognition in meiosis. *J. Theor. Biol.*, 2011, vol. 283, pp. 28-34.

14. Marx K.A., Zhou Y., Kishawi I.Q. Evidence for Long Poly(dA).Poly(dT) Tracts in D.Discoideum DNA at High Frequencies and Their Preferential Avoidance of Nucleosomal DNA Core Regions. *J. Biomol. Struct. & Dyn*., 2006, vol. 23, pp. 429-446.

15. Subirana J.A., Messeguer X. The most frequent short sequences in non-coding DNA. *Nucleic Acids Res*., 2010, vol. 38 (4), pp. 1172-1180.

16. Yagil G. The frequency of two-base tracts in eukaryotic genomes. *J. Mol. Evol.*, 1993, vol. 37, pp. 123-130.

17. Yagil G. DNA tracts composed of only two bases concentrate in gene promoters. *Genomics*, 2006, vol. 87, pp. 591-597.

18. Shomer D., Yagil G. Long W tracts are over-represented in the *E.coli* and *H.influenzae* genomes. *Nucl.AcidsRes.*, 1999, vol. 27, pp. 4491-4480.

19. Киселев С.С., Комаров В.М., Масулис И.С., Озолинь О.Н. Распределение мононуклеотидных повторов в бактериальных хромосомах. A/T-треки преобладают над G/C-треками. *Компьют. исследов. моделир*., 2010, т. 2, с. 183-187. [Kiselev S.S., Komarov V.M., Masulis I.S., Ozoline O.N. Distribution of mononucleotide repeats in bacterial chromosomes. Redundancy of A/T-tracts under G/C-tracts. *Computer researches & modelling*, 2010, vol. 2, pp. 183-187. (In Russ.)]

20. Piazza F., Lio P. Statistical analysis of simple repeats in the human genome. *Physica A*, 2005, vol. 347, pp. 472-488.

21. Dechering K.J., Cuelenaere K., Konings R.N.H., Leunissen J.A.M. Distinct frequency-distributions of homopolymeric DNA tracts in different genomes. *Nucleic Acids Research*, 1998, vol. 26, pp. 4056-4062.

22. Самченко А.А., Киселев С.С., Кабанов А.В., Кондратьев М.С., Комаров В.М. О природе доминирования олигомерных (dA:dT)n треков в структуре геномов эукариот. *Биофизика*, 2016, т. 6, с. 1045-1058. [Samchenko A.A., Kiselev S.S., Kabanov A.V., Kondratjev M.S., Komarov V.M. On the nature of oligo $(dA:dT)_n$ tracks domination in the structure of eukaryotic genomes. *Biofizika*, 2016, vol. 6, pp. 1045-1058. (In Russ.)]

23. Mackewicz D. [et al.] Distribution of Recombination Hotspots in the Human Genome – A Comparison of Computer Simulations with Real Data. *PLOS ONE*, 2013, vol. 8, e65272.

24. Cooper D.N., Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet.*, 1988, vol. 78, pp. 151-155.

25. Sved J., Bird A. The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1990, vol. 87, pp. 4692-4696.

26. Fryxell K.J., Moon W.J. CpG mutation rates in the human genome are highly dependent on local GC content. *Mol. Biol. Evol.*, 2005, vol. 22, pp. 650-658.

ON THE PECULIARITIES OF THE MECHANISM OF POINT SPONTANEOUS MUTATIONS IN HUMAN Y-CHROMOSOME STRUCTURE

Samchenko A.A., Kiselev S.S., Kondratyev M.S., Komarov V.M.
Institute of Cell Biophysics of RAS
Institutskaya str. 3a, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: komarov_vm@mail.ru

Abstract. The specific character of distribution of mononucleotide tracts and mixed W or S tracts in human Y and 22 chromosomes was analysed by comparative genomic approaches. It was found that in regulatory regions of Y chromosome anomalously high density of S (G/C)-tracts consisting of relatively short sequences (up to 6 base pairs) was observed. In primary structure of coding regions (exons) of 22 chromosome only a small redundancy of S- tracts was discovered. Previously in our papers we pointed to the non-trivial, increased ability of G/C pairs to a spontaneous change in the geometry of its complementary H-binding (because of the different dimensions of the hidden structural polymorphism of Watson-Crick G/C and A/T base pairs) in comparison with A/T pairs. In this case, revealed high density of S(G/C)-tracts in intergenic regions of Y chromosome indicated to possibility of increasing in the number of events of spontaneous complementarity lesions in this areas in comparison with similar events in the autosomic 22 chromosome. That is, in this way an abnormally high frequency of spontaneous point mutations in the Y chromosome compared with the frequency of similar mutations in other human chromosomes can be initiated. This is observed experimentally.

Key words*: DNA, chromosome structure, redundancy of S-tracts, structural polymorphism of Watson-Crick base pairs, frequency of spontaneous mutations.*

МОДЕЛЬ УРБОЭКОСИСТЕМ КАК ПРОЦЕСС АВТОВОЛНОВОЙ САМООРГАНИЗАЦИИ

Семина А.Е., Сидорова А.Э., Левашова Н.Т.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: sky314bone@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.07.2018.

Аннотация. В работе предложена модель пространственно-временной самоорганизации урбоэкосистем как суперпозиций сопряженных активных сред. В основе модели лежи модифицированное авторами уравнение ФитцХью–Нагумо, учитывающее неоднородности антропогенных (активатор) и природных (ингибитор) факторов в природно-антропогенных экосистемах. Обоснованность применения уравнения данного типа определяется относительной простотой системного анализа двух уравнений типа «активатор – ингибитор». Представлено аналитическое и численное исследование стационарных решений системы. Модель подтверждена данными динамики численности и плотности населения и картографическими данными развития Москвы (района Кунцево) с 1952 по 1968 годы. Рассмотрены прогнозные модели развития Новой Москвы и Шанхая с 2017 по 2030 гг. Предложенная модель позволяет выявлять пороговые значения управляющих параметров и основные принципы развития автоволновых процессов, формирующих структуры урбоэкосистем.

Ключевые слова: *активные среды, автоволновая самоорганизация, урбоэкосистемы.*

ВВЕДЕНИЕ

Урбоэкосистемы (УЭС) как сопряженные активные среды относятся к нелинейным динамическим макроструктурам, состоящим из сопряженных во времени и пространстве природных и антропогенных подсистем [1-3]. В УЭС имеется распределенный ресурс (население, промышленные и жилые объекты, транспорт, геобиоценозы). При наличии возмущения в соседних ячейках, связанного с изменением ресурса, процесс способен стать автокаталитическим. Так, в результате увеличения численности и плотности населения растет плотность застройки, увеличивается количество транспорта, промышленных предприятий, торговых и других сопутствующих росту населения структур, протяженность коммуникаций, расширяются границы УЭС, и растущие города имеют тенденцию к слиянию в общие системы. И результатом расширения и слияния УЭС является изменение площадей геобиоценозов, количественного (флуктуации) и качественного (бифуркации) состава трофических сетей. Управляющими параметрами процесса автоволновой самоорганизации являются природные и антропогенные факторы, формирующие длину и форму автоволн. При этом скорости антропогенных процессов, по меньшей мере, на порядок больше скоростей природных процессов, поэтому антропогенные процессы в данной модели мы полагаем активаторами, а природные – ингибиторами общесистемных процессов. Данные свойства позволяют качественно оценить пороговые и подпороговые условия распространения автоволнового процесса в зависимости от интенсивности источников воздействия, расположения возбудимых, слабовозбудимых и невозбудимых зон.

Модель урбоэкосистем как процесс автоволновой самоорганизации в активных средах

На базе уравнения ФитцХью-Нагумо [4] авторами предложена система уравнений [1-3]:

$$\begin{aligned} &\varepsilon\frac{\partial u}{\partial t}-\varepsilon D_u\Delta u=-\frac{1}{\varepsilon}\Big(u\big(u-\alpha\big(x,y\big)\big)\big(u-1\big)-uv\Big),\quad 0\le x,y\le L,\ t>0;\\ &\varepsilon\frac{\partial v}{\partial t}-\varepsilon D_v\Delta v=-\gamma v+\beta u. \end{aligned} \tag{1}$$

где u – функция интенсивности антропогенных процессов (активатор); v – функция интенсивности природных процессов (ингибитор). Введённое авторами произведение uv расширяет возможности математического анализа перекрестных взаимодействий активатора и ингибитора. Решения уравнения относительно u и v неотрицательны. α – параметр активации системы (определяется как величина, обратная плотности населения), $\alpha < 1$; γ – кинетический параметр затухания ингибитора, $\gamma > 0$; β – кинетический параметр взаимодействия активатора и ингибитора, $\beta > 0$; εD_u, εD_v – коэффициенты диффузии активатора и ингибитора; ε – параметр, отражающий значительное различие скоростей изменения функций активатора и ингибитора, $(0 < \varepsilon < 1)$. На границе расчетной области задаются краевые условия Неймана. Распределение в начальный момент времени считается известным. Численное решение двумерной задачи проводится в прямоугольнике $-L \le x \le L;\ -L \le y \le L$, в котором вводится равномерная сетка. Реализация численного счета производится при помощи схемы с эволюционной факторизацией [5]. Распределенные компьютерные вычисления проведены с помощью графических процессоров AMD и компилятора OpenCL.

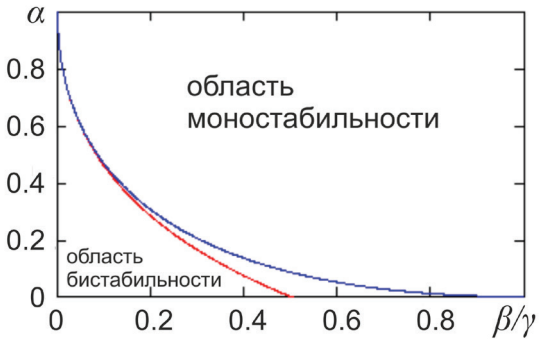


Рисунок 1. Диаграмма состояния активной среды в зависимости от соотношения параметров α, β и γ

Для вырожденного уравнения системы определены соотношения между параметрами α, β и γ, соответствующие бистабильной и моностабильной средам (рис. 1). В области моностабильности любое начальное возмущение затухает со временем, устойчивые состояния бистабильной среды – в области бистабильности. В области между синей и красной кривой возможно возникновение изменяющихся во времени локализованных в пространстве «делящихся» автоволн.

Модель была проверена на примере присоединения населенных пунктов Фили, Мазилово и Кунцево к Москве (1952-1968 гг.) [3]. На основе картографических данных с использованием приложения авторской разработки на язые C++, позволяющей создавать текстовые файлы с данными на основе изображений, была получена матрица значений параметра α размера [70*70], в дальнейшем использованная при численной реализации согласно модели. Основной код разработан в среде OpenCL и реализован с использованием графических процессоров AMD FIREPRO. Графическая интерпретация проведена с использованием программы «Serfer». Расчеты проводились согласно следующей модели:

$$\frac{\partial u}{\partial t} - D_u\left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}\right) = -\frac{1}{K_u^2 T^*} u\left(u - N_B K \alpha(x,y,t)\right)\left(u - N_B K\right) - \frac{1}{K_u T^*} uv, \qquad (2)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} - D_v\left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2}\right) = \frac{1}{T^*}\left(-\frac{1}{\gamma} v + \beta u\right).$$

где u (км^2) – площадь, застроенная на квадратный километр; v (км^2) – ингибитор негативных процессов застройки – площадь уничтоженных геобиоценозов – ингибитор (площадь биоценозов на территории Новой Москвы должна составить не менее 25 % от площади застройки); T^* = 1 год – характерный масштаб времени, K = 10 км^2 – характерная площадь одноподъездного дома с придомовой территорией; N_B = 80 – число зданий на квадратный километр; $\alpha(x,y,t)$ – функция, убывающая с ростом плотности населения: $\alpha = KN_B \exp\left(-0.05K\rho\right)$. Начальное распределение плотности населения: жилая застройка – ρ = 2000 чел/ км^2, промышленная территория – ρ = 200 чел/ км^2, парки, леса и водные преграды – ρ = 0; D_u = 5км^2/год – скорость роста площадей застройки; D_v = 0,1 км^2/год – скорость уменьшения площадей зеленых насаждений; γ – доля уничтоженной зелени от площади застройки. γ – в интервале 0 – 0,75; β=100/N_B – нормировочный коэффициент согласования локальной площади застройки с общей площадью застраиваемого района. Результаты численных расчетов представлены на рисунке 2.

Результаты численных расчетов согласно модели (2) хорошо согласуются с картографическими данными (рис. 2а, г). В ходе расширения территории Москвы лесопарковая территория вдоль реки и пруд стали естественными барьерами (рис. 2б, д), а застраивались небольшие естественные биоценозы (рис. 3 в, е). При этом малоэтажная застройка уступила место многоэтажной (рис. 3 б, д), что автокатализировало процесс увеличения численности и плотности населения на присоединенных территориях.

На основе аналогичного анализа и уравнения (2) авторами построена прогнозная модель развития Новой Москвы до 2030 г. (рис. 3). Основные параметры модели: ρ – планируемая плотность населения на этих территориях, согласно их назначению. Для жилого фонда плотной застройки и промышленной зоны ρ=4000 чел/км^2, для коттеджной застройки ρ=2000 чел/км^2, для территорий парков ρ = 0, $\alpha = KN_B \exp\left(-0.05K\rho\right)$ – параметр, характеризующий тип застройки. Планируемые лесопарковые территории составляют 10 % от общей площади. Учитывая скорости застройки территории Новой Москвы и меры, предпринимаемые по сохранению биоценозов, было принято D_u = 5 км^2·год$^{-1}$ и D_v = 0.1 км^2·год$^{-1}$ (D_v /D_u = 1/50). Численное значение кинетического параметра: γ = 0 для естественных биоценозов; γ = 0.1 для парков [6]; γ = 0,5 – для коттеджной застройки; γ = 0,75 для плотной застройки [8]; γ = 0,85 – для промышленных зон. Анализ картографических данных проведен

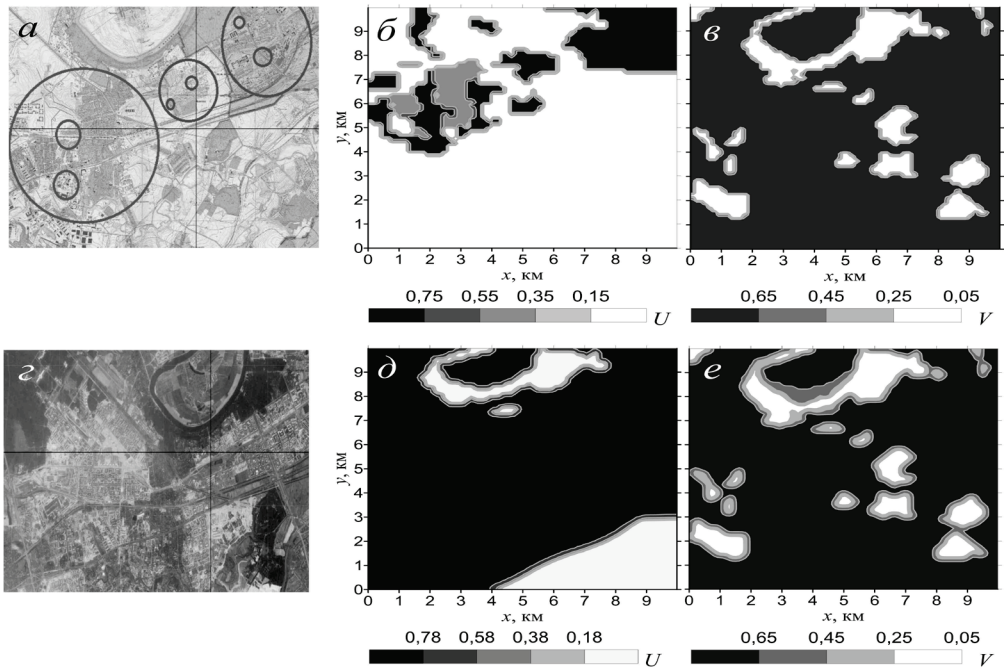


Рисунок 2. Модель расширения границ Москвы за счет присоединения г. Фили и поселка Мазилово к району Кунцево: а, б, в – начальные условия,1952 г.; г, д, е – 1968 г.

с использованием приложения авторской разработки на языке С++, позволяющей создавать текстовые файлы с данными на основе изображений.

Анализ данных модели показывает, что по мере расширения площади застройки будут сокращаться площади биоценозов (рис. 3б), и антропогенно преобразованные территории увеличатся на 5-10 %. Это приведет к снижению потенциала самоорганизации природных биоценозов и росту вероятности возникновения необратимых процессов в границах мегаполиса.

На основе уравнения (1) разработана модель территориального развития Шанхая до 2030 г.

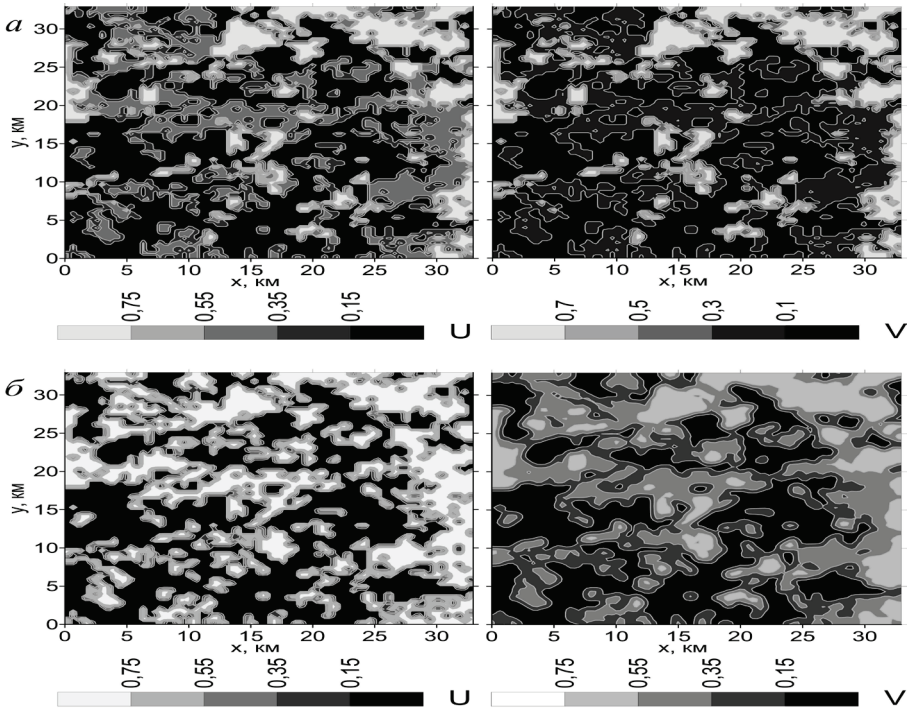


Рисунок 3. Модель развития Новой Москвы до 2030 года: U – пространственное распределение застройки, V – пространственное распределение биоценозов. а) 2017 г. – начальные условия; б) 2030 г. 0,85-0,75 – плотная застройка, 0,65-0,25 – коттеджная застройка, 0,1- 0,05 – лесопарковая зона

$$\frac{\partial u}{\partial t} - D_u\left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2}\right) = -\frac{1}{T^*}u\big(u - \alpha(x,y,t)\big)(u-1) - \frac{1}{T^*}uv,$$
$$\frac{\partial v}{\partial t} - D_v\left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2}\right) = \frac{1}{T^*}\big(-v + \gamma(x,y,t)u\big). \quad (3)$$

Здесь u – функция застройки (безразмерная доля с км^2) – активатор; v – функция цены (безразмерная доля от максимально возможной за м^2 жилой площади) – ингибитор; α – доля площади земель естественных биоценозов (рис. 4б): на западном направлении α = 0,3 – зона бистабильности, в зоне моря α ≈1, в районе р. Янцзы, на границе невозбудимой и бистабильной зон, α в интервале 0,5-0,7; γ – безразмерный параметр, показывающий зависимость стоимости м^2 жилья от района застройки. D_u – скорость изменения площади застройки, м^2·год$^{-1}$; D_v – скорость изменения цены на жилье в зависимости от района застройки и спроса на жилье (в юанях в год). На основании анализа данных за 2005-2017 годы принимаем следующие значения: внутри круга меньшего радиуса на рисунке 4а D_u= 5067 га·год $^{-1}$, внутри круга большего радиуса (рис. 4б) D_u= 930 га ·год $^{-1}$, $D_v = 0{,}22D_u$.

С 2000 по 2010 годы расширение границ Шанхая происходило, в основном, за счет сельскохозяйственных земель и прибрежной территории [9]. Но для сбалансированного экономического развития региона необходимо сохранение баланса между антропогенными и природными процессами в условиях роста численности населения. Особенно при условии увеличения спроса на улучшение качества жизни. Анализ разработанной модели показал, что сохранение сложившейся к 2017 г. зональности застройки (рис. 4 б) позволит не только удовлетворить спрос на жилье значительной массы населения, но и устойчиво развиваться в соответствие с нормативами сохранения естественных биоценозов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использованный нами подход основан на представлениях об автоволновой самоорганизации в активных средах. В настоящей работе в качестве антропогенных факторов, контролирующих пространственно-временную структуру развития урбоэкосистем, рассмотрены факторы социально-экономического и физико-химического характера. Установлено, что при переходе из одной УЭС в другую плотность населения и соотношение γ/β изменяется скачкообразно. Этот вывод соответствует теории самоорганизации: при переходе на новый уровень происходит качественный скачок в структуре и функциях системы. Особенно это характерно для развития

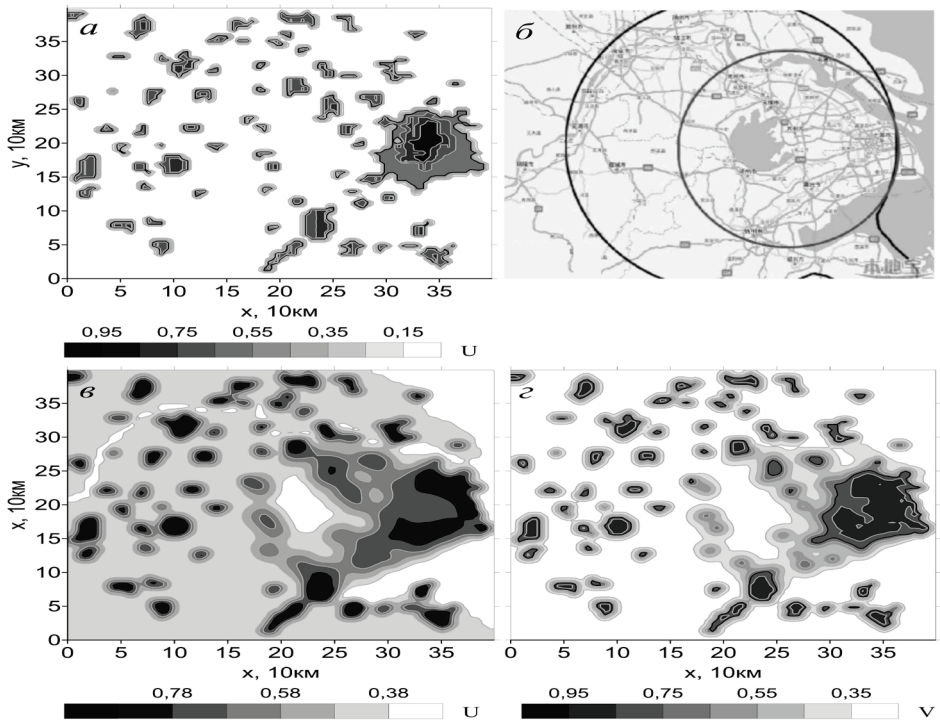


Рисунок 4. Модель развития Шанхая до 2030 года: а) карта застройки, согласно планам развития Шанхая, 2015 г.; б) карта плотности населения, 2016 г.; в) застройка (u), 2016 г.; г) застройка (u), 2030 г. а) плотность застройки в 2017 г.; б) карта застройки; в) плотность застройки, прогнозируемая согласно модели, к 2030 году; г) цена квадратного метра жилой площади, нормированная на максимум, прогнозируемая согласно модели, к 2030 году.

мегаполисов за счет прилегающих территорий – небольших городов, которые в результате присоединения попадают на новый иерархический уровень эволюции УЭС – мегаполисов. Предложенная модель позволяет описывать характерные свойства УЭС, а обоснованность ее применения подтверждается аналитическими и численными методами.

Исследование выполнено в рамках реализации проекта Российского Научного Фонда (грант 18-11-00042).

Список литературы / References:

1. Сидорова А.Э., Левашова Н.Т., Мельникова А.А., Дерюгина Н.Н., Семина А.Е. *Вестник Московского Университета*. *Серия 3. Физика. Астрономия*, 2016, № 6, с. 39-45. [Sidorova A.E., Levashova N.T., Melnikova A.A., Deryugina N.N., Semina A.E. *Moscow University Physics Bulletin*, 2016, vol. 71, no. 6, pp. 562-568 (In Russ.)]

2. Levashova N., Melnikova A., Semina A., Sidorova A. *Communication on Applied Mathematics and Computation*, vol. 31, no. 1, pp. 32-42.

3. Сидорова А.Э., Левашова Н.Т., Мельникова А.А. [и др.] *Математическая биология и биоинформатика*, 2017, т. 12, № 1, с. 186-198. [Sidorova A.E., Levashova N.T., Melnikova A.A., Semina A.E. *Mathematical Biology and Bioinformatics*, 2017, vol. 12, no. 1, pp. 186-198. (In Russ.)]

4. FitzHugh R.A. Impulses and physiological states in theoretical model of nerve membrane. *Biophys. J.*, 1961, pp. 445-466.

5. Калиткин Н.Н., Корякин П.В. *Численные методы: Методы математической физики*. М: Издательский центр «Академия», 2013, 303 с. [Kalitkin N.N., Koryakin P.V. *Numerical methods: Methods of mathematical physics*. M: Publishing Center "Academy", 2013, 303 p. (In Russ.)]

MODEL OF UBO-ECOSYSTEMS AS A PROCESS AUTOMOBILE SELF-ORGANIZATION

Semina A.E., Sidorova A.E., Levashova N.T.
Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory St., 1/2, Moscow, 119234, Russia; e-mail: syoanya@yandex.ru

Abstract. A model of spatio-temporal self-organization of urinean ecosystems as superpositions of conjugate active media is proposed. At the heart of the model is the modified FitzHugh-Nagumo equation, which takes into account the inhomogeneities of anthropogenic (activator) and natural (inhibitor) factors in the human-anthropogenic ecosystems. The validity of the application of an equation of this type is determined by the relative simplicity of the system analysis of two equations of the "activator-inhibitor" type. An analytical and numerical study of stationary solutions of the system is presented. The model is confirmed by the data of population density and population density and map data of the development of Moscow (Kuntsevo district) from 1952 to 1968. The forecast models of the development of New Moscow and Shanghai from 2017 to 2030 are considered. The proposed model makes it possible to identify threshold values of control parameters and the main principles of the development of autowave processes forming the structures of urineecosystems

Key words: *active media, autowave self-organization, urban ecosystems.*

РЕГУЛЯЦИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ ГОНАРТРОЗЕ

Внуков В.В.[1], Кролевец И.В.[2], Панина С.Б.[1], Милютина Н.П.[1], Плотников А.А.[1], Забродин М.А.[2]

[1] Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И.Ивановского
ул. Стачки 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: npmilutina@sfedu.ru
[2] Ростовский государственный медицинский университет
Нахичеванский пер., 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, РФ
Поступила в редакцию: 30.06.2018.

Аннотация. Цель работы - исследование роли системы прооксиданты↔антиоксиданты и ее регуляции в молекулярных механизмах посттравматического гонартроза (ПТГА). Обследовано 95 пациентов с диагнозом ПТГА, которые были разделены на 3 группы в соответствии со стадией заболевания (I-III) по шкале Kellgren/Lawrence. Исследовали показатели окислительного стресса в плазме, клетках крови и синовиальной жидкости (СЖ). В качестве контроля исследована кровь 20 практически здоровых доноров соответствующего пола и возраста. Развитие дегенеративного процесса в тканях сустава при ПТГА сопровождается нарушением свободнорадикального гомеостаза в синовиальной среде сустава и в крови. Изменение параметров люминол-зависимой ХЛ сопровождается повышением интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме, эритроцитах и СЖ пациентов с ПТГА, что подтверждается возрастанием уровня МДА. Одновременно в плазме крови и СЖ повышается уровень нитритов/нитратов (NOx^-), что указывает на развитие нитрозильного стресса. Развитие ПТГА сопровождалось дисфункцией компонентов антиоксидантной системы, снижением общего антиокислительного потенциала плазмы и синовиальной жидкости в обследованных группах пациентов относительно контроля. Активность компонентов прооксидантной системы - миелопероксидазы и ксантиноксидазы - в крови и СЖ коррелировала с тяжестью патологического процесса при ПТГА. В молекулярных механизмах патогенеза ПТГА важнейшая роль принадлежит локальному и системному окислительному стрессу, который развивается в тканях сустава и крови.
Ключевые слова: *посттравматический гонартроз, кровь, синовиальная жидкость, окислительный стресс, прооксиданты, антиоксиданты.*

Гонартроз (ГА) – остеоартроз коленного сустава, возраст-ассоциированное заболевание, одна из причин хронической нетрудоспособности. В целом, большинство людей старше 65 лет имеют рентгенологические и/или клинические свидетельства развития остеоартроза, при этом их частота увеличивается каждые 10 лет жизни: от 33 % у 60-70-летних до 43,7 % у 80-летних [1]. В основе развития артроза лежат такие патологические процессы, как потеря функциональности тканей сустава, воспаление и стресс, системный ответ организма на которые включает в себя активацию свободнорадикального окисления и развитие окислительного стресса [2]. Артроз является системным полиморбидным заболеванием, которое рассматривается не только с позиции локальной суставной патологии, но и с позиции нарушения многих факторов обмена веществ [3].

При артрозе все ткани и клетки сустава вовлечены в патологический воспалительный процесс, при этом окислительный стресс, дисбаланс процессов репарации и деградации матрикса хряща, митохондриальная дисфункция и апоптоз хондроцитов являются патогенетическими звеньями развития дегенеративно-дистрофического процесса в суставе [4]. Травма коленного сустава является одним из главных факторов риска развития посттравматического гонартроза (ПТГА) и способна инициировать воспаление в суставе. Артроз является наиболее распространенным заболеванием суставов и приводит к развитию болевого синдрома, инвалидности пациентов и экономическим потерям. Значительная доля (около 12 %) всех случаев артроза развивается вторично вследствие травмы сустава [5]. ПТГА обычно диагностируется в более раннем возрасте и прогрессирует значительно быстрее, чем первичный артроз. Поскольку большинство травм коленного сустава получают люди молодого возраста, то развитие ПТГА в возрасте 30-40 лет – отдалённая, но весьма реальная возможность. Поиск способов ранней диагностики ПТГА и новых терапевтических подходов требует всесторонних исследований.

Цель работы – исследование роли системы прооксиданты↔антиоксиданты и ее регуляции в молекулярных механизмах посттравматичского гонартроза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Критериями включения в группу для анализа являлись следующие характеристики: боль в коленном суставе, затрудненная ходьба, ограничение движений в суставе, подтвержденный диагноз – гонартроз (ГА) I-IV стадий по шкале Kellgren/Lawrence, K/L (рентгенограммы, полная история болезни, анкеты). Критериями исключения были: дисплазия скелета, изменения оси конечности в области пораженного сустава, коллагенозы, алкогольная/наркотическая зависимость, почечная/печеночная недостаточность. Общее количество пациентов с

подтвержденным диагнозом посттравматический гонартроз составило 95 человек (50 мужчин/45 женщин), которые были разделены на 3 группы в зависимости от стадии ПТГА: 1 группа – I стадия, 2 группа – II стадия, 3 группа – III-IV стадии (средний возраст 39,19±1,73 лет; ИМТ 26,13±0,71 кг/м^2). В качестве контроля исследована кровь 20 практически здоровых доноров соответствующего пола и возраста.

Кровь отбирали в утренние часы из локтевой вены в стерильные пробирки с K_2-ЭДТА в качестве антикоагулянта. Синовиальную жидкость (СЖ) собирали в пробирки с гепарином путем артроцентеза коленного сустава. Определение биохимических показателей проводили в плазме, мононуклеарной фракции и эритроцитах крови, а также синовиальной жидкости. Выделение мононуклеарной фракции осуществляли из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина, ρ=1,077 г/см^3 [6].

Уровень свободнорадикального окисления оценивали по интенсивности люминол-зависимой H_2O_2-индуцированной хемилюминесценции (ЛХЛ) [7] и содержанию малонового диальдегида (МДА) [8]. Содержание маркеров нитрозильного стресса - нитритов/нитратов - оценивали колориметрическим методом, основанным на реакции Грисса [9]. О состоянии антиоксидантной системы судили по активности супероксиддисмутазы (СОД)/супероксидустраняющей активности (СУА) [10], каталазы/скорости утилизации перекиси водорода (V_{H2O2}) [11], глутатион-зависимой антиоксидантной системы [12]. Определяли активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-S-трансферазы (GST), глутатионредуктазы (ГР), содержание восстановленного глутатиона (GSH). Состояние прооксидантной системы характеризовали по активности НАДФН-оксидазы [13], миелопероксидазы (МПО) [14]. Активность ксантиноксидоредуктазы (КОР) определяли по [15], концентрацию мочевой кислоты определяли колориметрическим методом («Витал», Россия).

Статистический анализ проводился с помощью пакета STATISTICA 6.1. Для оценки различий между сравниваемыми группами использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни для двух независимых выборок, тест Краскела-Уоллиса (H-критерий) и медианный тест для сравнения нескольких независимых групп. Различия между двумя выборками считали достоверными при $p<0,05$. При $0,05<p<0,1$ рассматривали тенденцию к изменениям. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического рангового коэффициента корреляции Спирмена. Методы множественной регрессии использовали для анализа связи между несколькими независимыми переменными и зависимой переменной.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено изменение параметров люминол-зависимой H_2O_2-индуцируемой ХЛ в плазме крови и СЖ у больных ПТГА по сравнению с донорами. При ПТГА амплитуда быстрой вспышки ЛХЛ в плазме крови и СЖ уменьшается на 35-54 %, что может отражать снижение уровня гидроперекисей липидов, обусловленное активацией ферментов их утилизации – глутатионпероксидазы, а в СЖ и глутатион-S-трансферазы. Высота медленной вспышки у больных с ПТГА повышается в плазме крови на 138 %, а в СЖ – на 91 %, демонстрируя повышенную способность липидов к перекисному окислению. Светосумма медленной вспышки в плазме крови больных с ПТГА повышается на 88 %, что может указывать на снижение числа боковых цепей разветвления и количества липидных радикалов.

Таким образом, развитие дегенеративного процесса в тканях сустава при ПТГА сопровождается нарушением свободнорадикального гомеостаза как в синовиальной среде сустава, так и в крови. Изменение параметров ЛХЛ сопровождается повышением интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме, эритроцитах и СЖ пациентов с ПТГА, что подтверждается возрастанием уровня молекулярного продукта ПОЛ - МДА в обследованных группах пациентов. При этом показана положительная корреляция содержания МДА в СЖ и плазме ($R=0,443$, $p=0,008$). Малоновый диальдегид (МДА) – вторичный продукт ПОЛ, способный вступать в реакции с аминосодержащими соединениями (белки, пептиды, нуклеотиды, аминолипиды) с образованием аддуктов (ALE, advanced lipid peroxidation end products), что приводит к внутри- и межмолекулярным сшивкам и нарушениям функций белков и других аминосодержащих соединений [16]. Такие продукты ПОЛ, как МДА и 4-гидроксиноненаль, обнаружены в хрящевой ткани при артрозе и способствуют процессам ее деградации.

Особая роль в патогенезе ПТГА принадлежит оксиду азота (NO•), который относится к активированным кислородным метаболитам (АКМ) и медиаторам воспаления, способствуя развитию окислительного стресса и воспаления при дегенеративных заболеваниях суставов. Важнейшим компонентом окислительного стресса, который развивается при ПТГА, является нитрозильный стресс, который сопровождается гиперпродукцией активных форм азота (АФА), взаимодействующих с биологическими молекулами путем нитрования, нитрозилирования и окисления с нарушением их структуру и функции [2, 17].

При ПТГА содержание стабильных метаболитов оксида азота – нитритов/нитратов (NOx^-) – в плазме крови в 1-3 группах пациентов увеличивается на 51-61 % относительно нормы, в СЖ возрастает на 40-59 % при сравнении с плазмой крови здоровых людей. В ходе исследования обнаружена корреляционная зависимость между уровнем нитритов/нитратов в плазме и синовиальной жидкости пациентов с ПТГА 1 группы ($R=0,64$, $p<0,05$), 2 группы ($R=0,74$, $p<0,05$) и 3 группы ($R=0,87$, $p<0,05$). Высокие локальные концентрации NO• негативно влияют на функции хондроцитов, ингибируя синтез компонентов матрикса – коллагена и протеогликанов, активируя металлопротеиназы, уменьшая экспрессию антагониста рецептора IL-1β, ингибируя пролиферацию хондроцитов [17]. Нитрозильный стресс, развивающийся в плазме крови и синовиальной жидкости пациентов с ПТГА, может быть обусловлен активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая экспрессируется в хрящевой ткани и продуцирует большие количества NO• при артрозе под действием провоспалительных

цитокинов [18]. В свою очередь, NO• и активные формы азота (NO_2•, $ONOO^-$, NOx^- и др.) способствуют развитию мощного катаболического ответа в тканях сустава путем ингибирования синтеза протеогликанов и коллагена, нитрования остатков тирозина в белках, активации матриксных металлопротеиназ, усиления воспалительной реакции и апоптоза хондроцитов через митохондриально-зависимый механизм.

В ходе работы был проанализирован редокс-статус клеток крови, плазмы и синовиальной жидкости при ПТГА. Установлено, что в эритроцитах пациентов наблюдается нарушение баланса функционирования антиоксидантных ферментов, включая СОД, каталазу и ГПО, что может приводить к накоплению гидропероксида в клетках, а также значительное снижение уровня восстановленного глутатиона. Известно, что H_2O_2 ингибирует синтез протеогликанов матрикса хрящевой ткани, а также активность фермента гликолиза глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в хондроцитах, индуцирует апоптоз хондроцитов, а также приводит к генерации активных форм кислорода (АФК) и дисфункции митохондрий.

При посттравматическом гонартрозе наблюдается значительная активация ГПО в мононуклеарных клетках и синовиальной жидкости, что согласуется со снижением содержания GSH в СЖ. В мононуклеарных клетках пациентов с гонартрозом наблюдается активация глутатионредуктазы.

В целом, в ходе исследования установлено, что развитие ПТГА сопровождалось снижением общего антиокислительного потенциала (ОАП) плазмы и синовиальной жидкости в обследованных клинических группах пациентов по сравнению с контролем, что обусловлено сдвигом равновесия в системе прооксиданты↔антиоксиданты в сторону усиления свободнорадикальных процессов.

Проведенное исследование свидетельствует о повышение активности прооксидантных ферментов: НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы, ксантиноксидазы в мононуклеарах пациентов с ПТГА трех клинических групп. Активность НАДФН-оксидазы в мононуклеарах крови (лимфоциты, моноциты) возрастает на 25-48 % у пациентов с ПТГА трех групп относительно контроля. Полагают, что при артрозе НАДФН-оксидаза является важнейшим источником АФК как в тканях сустава, так и в крови [19]. Обнаружена корреляционная взаимосвязь между активностью НАДФН-оксидазы, степенью деградации хряща и тяжестью протекания заболевания. Исследование активности миелопероксидазы, являющейся маркером воспалительной реакции, показало, что активность фермента в мононуклеарной фракции крови трех групп больных ПТГА возрастает на 102-130 % относительно контроля. В СЖ активность МПО возрастает на 268-347 % относительно плазмы крови в норме. В настоящем исследовании обнаружена корреляционная взаимосвязь между активностью МПО в мононуклеарной фракции крови и синовиальной жидкости I группы ($R=0,77$, $p<0,05$), II группы ($R=0,63$, $p<0,05$) и III группы ($R=0,76$, $p<0,05$) пациентов с ПТГА.

Как показало проведенное исследование, активность ксантиноксидоредуктазы (КОР) в плазме крови у пациентов с ПТГА была значительно выше, чем в контроле. Содержание мочевой кислоты (МК) в плазме крови у пациентов с ранним ПТГА (K/L 1,2) и поздним ПТГА (K/L 3) было значимо больше, чем у здоровых добровольцев ($p = 0,013$).

На основе изменений активности миелопероксидазы, ксантиноксидоредуктазы в мононуклеарной фракции и уровня мочевой кислоты в плазме крови нами был разработан тест для дифференциальной диагностики стадий гонартроза. Рассчитывается суммарный коэффициент К, после чего диагностируется стадия ПТГА. При выполнении условия $3,1\leq К<3,4$ диагностируют I стадию; при выполнении условия $3,4\leq К<3,9$ диагностируют II стадию; при выполнении условия $3,9\leq К<5,2$ диагностируют III стадию; при выполнении условия $К\geq5,2$ диагностируют IV стадию гонартроза по шкале Kellgren-Lawrence. Описываемый способ позволяет своевременно диагностировать заболевание и подобрать необходимый курс терапии для пациента.

В результате проведения множественного линейного регрессионного анализа с учётом возраста, пола, ИМТ пациентов была получена высоко достоверная регрессионная модель ($r = 0,947$, $p = 0,00002$) прогрессирования ПТГА со стадией по шкале K/L в качестве зависимой переменной. В указанную модель из всех исследованных показателей включены два значимых фактора ($p < 0,01$) – активность КОР в СЖ и возраст пациента. При оценке ранговых корреляций Спирмена оказалось, что со стадией ПТГА положительно коррелируют те же самые показатели: возраст, активность КОР в СЖ, а также ИМТ и пол пациента. Установлено, что артроз прогрессирует быстрее у женщин ($r = -0,346$, $p = 0,003$), а также у людей с повышенным ИМТ ($r = 0,481$, $p< 0,0001$). Возможными причинами того факта, что женщины более подвержены развитию гонартроза, являются анатомические (меньший объём хрящевой ткани), генетические и гормональные (колебания уровня эстрогенов) особенности женщин по сравнению с мужчинами [20]. С ИМТ пациента также положительно коррелирует уровень МК в плазме крови ($r = 0,286$, $p = 0,232$). Следовательно, активность КОР в СЖ является значимым предиктором рентгенологической стадии ПТГА, в том числе ранней (I) стадии.

Известно, что КОР экспрессируется синовиоцитами и другими клетками суставных тканей. КОР, особенно ксантиноксидазная изоформа, которая экспрессируется в результате развития воспаления при травме, играет значительную роль в развитии посттравматического артроза [21]. Следует отметить, что ксантиноксидаза особенно важна в патогенезе суставных заболеваний, поскольку более 50 % синовиальной КОР представлено именно оксидазной формой [21].

Таким образом, в молекулярных механизмах патогенеза ПТГА важнейшая роль принадлежит локальному и системному окислительному стрессу, который развивается в тканях сустава и крови. При ПТГА наблюдается существенный сдвиг в системе прооксиданты↔антиоксиданты в синовиальной жидкости и крови, сопровождающийся интенсификацией свободнорадикального окисления и усилением повреждения тканей сустава. Активность компонентов прооксиданоной системы – МПО и КОР – в крови и синовиальной жидкости коррелировала с тяжестью патологического процесса при ПТГА.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП "Высокие технологии" ЮФУ в рамках базовой части госзадания МОН, проект № 6.6762.2017/БЧ.

Список литературы / References:

1. Anderson A.S., Loeser R.F. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2010, vol. 24, pp. 15-26.

2. Lepetsos P., Papavassiliou A.G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1862, pp. 576-591.

3. Насонова В.А. Остеоартроз – проблема полиморбидности. *Consilium Medicum*, 2009, т. 11, с. 5-8. [Nasonova V.A. Osteoarthritis is a problem of polymorbidity. *Consilium Medicum*, 2009, vol. 11, pp. 5-8. (In Russ.)]

4. Punzi L., Galozzi P., Luisetto R., Favero M., Ramonda R., Oliviero F., Scanu A. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. *RMD Open*, 2016, vol. 2, pp. 1-9.

5. Thomas A.C., Hubbard-Turner T., Wikstrom E.A., Palmieri-Smith R.M. Epidemiology of Posttraumatic Osteoarthritis. *J. Athletic Training*, 2017, vol. 52, pp. 491-496.

6. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 1968, vol. 97, pp. 77-89.

7. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода. *Вопр. мед. химии*, 1979, № 2, с. 132-137. [Shestakov V.A., Boichevskaya N.O., Sherstnev M.P. The chemiluminescence of blood plasma in the presence of hydrogen peroxide. *Vopr. Med. Khim.*, 1979, no. 2, pp. 132-137. (In Russ.)]

8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии* / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977, с. 66-68. [Stal'naya I.D., Garishvili T.G., The method of determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid, in *Sovremennye metody v biokhimii* (Modern Methods Applied in Biochemistry), Orekhovich V.N., Ed., Moscow: Meditsina, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]

9. Голиков П.П. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М.: Медпрактика, 2004. [Golikov P.P., *Oksid azota v klinike neotlozhnykh zabolevanii.* (Role of Nitrogen Oxide in Clinics of Urgent Diseases), Moscow: Medpraktika, 2004. (In Russ.)]

10. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопр. мед. химии*, 1999, т. 45, с. 14-15. [Sirota T.V. New approach to investigation of autooxidation of adrenaline and its use for change of superoxide dismutase. *Vopr. Med. Khim.*, 1999, vol. 45, pp. 14-15. (In Russ.)]

11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. A method for determination of catalase activity, *Lab. Delo*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]

12. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации*. СПб: ИКФ «Фолиант», 2000, 104 с. [Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. Metodi otsenki svobodnoradikalnogo okislenia i antioksidantnoi sistemi organizma. Metodicheskie recomendatsii (Methods for assessing free radical oxidation and the body's antioxidant system. Guidelines), SPb: IKF "Foliant", 2000, 104 p. (In Russ.)]

13. Длужевская Т.С., Погорелова Т.Н., Афонин А.А. Активность НАДФН-оксидазы в оценке состояния новорожденных детей. *Педиатрия*, 1989, № 3, с. 44-47. [Dluzhevskaya T.S., Pogorelova T.N., Afonin A.A. NADPH_oxidase activity in determination of newborn health status. *Pediatriya*, 1989, no. 3, pp. 44-47. (In Russ.)]

14. Саидов М.З., Пинегин Б.В. Спектрофотометрический метод определения миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках. *Лаб. дело*, 1991, № 3, с. 56-59. [Saidov M.Z., Pinegin B.V. Spectrophotometric method of myeloperoxidase assay in phagocytic cells, *Lab. Delo*, 1991, no. 3, pp. 56-59. (In Russ.)]

15. Avis P.G., Bergel F., Bray R.C. Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. *J. Chem. Soc.*, 1955, pp. 1100-1105.

16. Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, vol. 177, pp. 1249-1262.

17. Abramson S.B. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, vol. 16, suppl. 2, S15-S20.

18. Castro R.R., Cunha F.Q., Silva F.S.Jr., Rocha F.A. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis-evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, vol. 14, pp. 769-776.

19. Hsu H.-C., Chang W.-M., Wu J.-Y., Huang C.-C., Lu F.-J., Chuang Y.-W., Chang P.-J., Chen K.-H., Hong C.-Z., Yeh R.-H., Liu T.-Z., Chen C.-H. Folate Deficiency Triggered Apoptosis of Synoviocytes: Role of Overproduction of Reactive Oxygen Species Generated via NADPH Oxidase/Mitochondrial Complex II and Calcium Perturbation. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, pp. 1-21.

20. Hame S.L., Alexander R.A. Knee osteoarthritis in women. *Curr. Rev. Muskuloskelet. Med.*, 2013, vol. 6, pp. 182-187.

21. Stabler T., Zura R.D., Hsueh M.F., Kraus V.B. Xanthine oxidase injurious response in acute joint injury. *Clin. Chim. Acta*, 2015, vol, 451(Pt. B), pp. 170-174.

THE REGULATION OF FREE RADICAL OXIDATION IN BLOOD AND SYNOVIAL FLUID IN POSTTRAUMATIC GONARTHROSIS

Vnukov V.V.[1], Krolevets I.V.[2], Panina S.B.[1], Milyutina N.P.[1], Plotnikov A.A.[1], Zabrodin M.A.[2]

[1] Southern Federal University, Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology

Stachky st., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: npmilutina@sfedu.ru

[2] Rostov State Medical University

Nahichevansky lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

Abstract. The aim of the work is to study the role of the prooxidants↔antioxidants system and its regulation in the molecular mechanisms of posttraumatic gonarthrosis (PTGA). We examined 95 patients diagnosed with PTGA who were divided into 3 groups according to the stage of the disease (I-III) according to the Kellgren / Lawrence scale. The indices of oxidative stress in plasma, blood cells and synovial fluid (SF) were studied. As a control, the blood of 20 practically healthy donors of the corresponding sex and age was examined. The development of the degenerative process in the joint tissues at PTGA is accompanied by a violation of free radical homeostasis in the synovial environment of the joint and in the blood. The change in the parameters of luminol-dependent CL is accompanied by an increase in the intensity of lipid peroxidation (LPO) in plasma, erythrocytes and SF of patients with PTGA, which is confirmed by an increase in the level of MDA. Simultaneously, the level of nitrites / nitrates (NOx) increases in blood plasma and SF, which indicates the development of nitrosative stress. The development of PTGA was accompanied by dysfunction of the components of the antioxidant system, a decrease in the total antioxidant potential of plasma and synovial fluid in the groups of patients. The activity of the components of the prooxidant system - myeloperoxidase and xanthine oxidase - in the blood and SF correlated with the severity of the pathological process in PTGA. The local and systemic oxidative stress which develops in the joint tissues and blood plays a crucial role in PTGA.

Key words: *posttraumatic gonarthrosis, blood, synovial fluid, oxidative stress, prooxidants, antioxidants.*

ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕРАЦИИ 2-ДЕЗОКСИ-D-РИБОЗО-1-ФОСФАТА ОПУХОЛЬЮ, СВЯЗЬ С ПРОДУКЦИЕЙ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Бакурова Е.М.

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

пр. Ильича, 16, г. Донецк, 83003, Украина; e-mail: 32023@ mail.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Выполнено сравнительное исследование активности ферментов обмена тимидина, аденозина и антиоксидантной системы в 44 образцах тканей эпителиальных опухолей распространенного рака желудка и кишечника (ЖКТ), немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ). В качестве индивидуального контроля использовали нетрансформированные ткани края резекции. Выявлено повышение опухолевой активности тимидинфосфорилазы (ТФ) в 1,8 раза ($p = 0,002$) и аденозиндезаминазы (АДА) в 1,7 – 1,9 раз ($p = 0,001$); установлена корреляция трансферазной активности ТФ и АДА ($\rho = 0,704$; $p < 0,001$). Это обеспечивает как продукцию 2-дезокси-D-рибозо-1-фосфата (2-д-D-Риб-1-Ф), так и ресинтез дезокситимидина, необходимого для синтеза дезокситимидилата по «запасному пути». При этом снижение активности глутатионпероксидазы способствует как усилению процессов гликирования в опухолях избыточной 2-д-D-Риб, так и повышению уровней H_2O_2. Сделан вывод, что данные особенности обмена способствуют резонированию эффектов гликативного и оксидативного стрессов, сопровождающих опухолевую прогрессию.

Ключевые слова: *ферменты, 2-дезокси-D-рибоза, перекись водорода, опухоль.*

В настоящее время одним из промоутеров опухолевой прогрессии считают гликативный стресс. В частности, с ним связывают активацию ангиогенеза, метастазирование, инвазию, устойчивость к апоптозу, иммуносупрессию [1]. Его реализуют конечные продукты неферментативного гликирования (гликозилирования, или «advanced glycation end products» - AGEs). Было установлено, что продукция дикарбонилов и AGEs может быть опосредована повышением уровней клеточной альдопентозы – 2-дезокси-D-рибозы (2-д-D-Риб) [2]. Существенный вклад в генерацию фосфорилированной 2-д-D-Риб может иметь фермент «запасного пути» синтеза тимидилата – тимидинфосфорилаза [3]. Продукт обратимого фосфоролиза дезокситимидина – 2-дезокси-D-рибозо-1-фосфат активирует ангиогенез [3], повышает продукцию активных форм кислорода (АФК) [4]. Параллельному увеличению продукции АФК и радикалов способствует ингибирование 2-д-D-Риб синтеза глутатиона, необходимого клетке для детоксикации AGEs [5].

С индивидуальными особенностями экспрессии и активности ТФ связаны чувствительность опухоли к фторпиримидинам, усиление ангиогенеза, метастазирования, пролиферации, устойчивость к апоптозу [6]. Полифункциональность фермента обусловлена не только эффектами продуктов реакции, но и видами его активности. Образование дезокситимидина (субстрата для тимидинкиназы - маркера пролиферации) возможно преимущественно за счет его альтернативной трансферазной активности. В качестве косубстрата – донора фосфопентозы может быть использован пуриннуклеозид. Считаем, что одновременное исследование классической фосфорилазной активности (катаболической, ТФк) вместе с трансферазной (анаболической, ТФан), позволит учитывать как ангиогенные, антиапоптозные эффекты ТФ, так и пропролиферативные. В условиях in vivo естественным поставщиком косубстрата для ТФан является аденозиндезаминаза (АДА) – фермент, лимитирующий клеточные уровни еще одной регуляторной молекулы – аденозина. Ранее нами была исследована метаболическая гетерогенность аденокарцином желудка, кишечника, немелкоклеточного рака легких. Установлена корреляция активности ТФан и АДА, а также ТФан и ТФк с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухоли (соответственно, с уровнями Ki-67, CD34) [6]. В то же время исследования кумулятивного эффекта особенностей активности ТФ и усиления прооксидантных процессов в опухолях немногочисленны. В данной работе опухолевую активность ферментов обмена тимидина и аденозина изучали параллельно с активностью ферментов антиоксидантной системы (АОС) – супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО).

Цель исследования: в опухолях различной локализации изучить особенности видов активности тимидинфосфорилазы, аденозиндезаминазы, сопоставив с активностью ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выполнено сравнительное исследование активности ферментов в 44 образцах тканей эпителиальных опухолей распространенного рака желудка и кишечника (ЖКТ), немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ) $T_{3\text{-}4}N_xM_{0\text{-}1}$ стадий. Индивидуальным контролем служили нетрансформированные ткани края резекции. Виды активности ТФ определяли спектрофотометрически на СФ-46 при λ 300 и 267 нм по изменениям оптической плотности тимина (тимидина) в 0,01 нNaOH [7]. Активность аденозиндезаминазы исследовали по снижению оптической плотности аденозина при 265 нм [7]. Метод определения активности супероксидисмутазы основан

на способности СОД тормозить автоокисление адреналина [8]. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) оценивали по изменению содержания восстановленного глутатиона, определяя его коньюгаты с 2-нитро-5-тиобензоатом [8]. Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью лицензионных программ «MedStat» (Альфа) и «Statistica 5.5» (StatSoft). Для проверки распределения на нормальность применялся критерий W Шапиро-Уилка. При анализе данных для оценки генеральной совокупности использовались стандартные характеристики, проводился однофакторный анализ Крускалла-Уоллиса и медианный тест (χ^2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности видов активности ферментов изучали в сопоставлении с индивидуальным контролем в гомогенатах тканей немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), аденокарцином желудка и кишечника (ЖКТ) (табл. 1).

Таблица 1. Активность ферментов антиоксидантной системы, катаболизма тимидина и аденозина в тканях рака легких, желудка, кишечника, нмоль/мин·мг (медиана, первый и третий квартили)

	СОД		ГПО		ТФк		ТФан		АДА	
	К-ль	Рак	К-ль	Рак	К-ль	Рак	К-ль	Рак	К-ль	Рак
Легкие (n = 22)	0,99 (0,80; 1,14)	0,95 (0,69; 1,38)	3,38 (2,30; 5,12)	2,88 * (1,90; 4,16)	96,08 (78,88; 129,41)	171,06** (120,24; 211,88)	129,07 (106,70; 150,00)	201,73** (148,88; 264,49)	122,31 (103,24; 149,05)	202,30** (181,14; 231,14)
ЖКТ (n = 22)	1,18 (0,96; 1,47)	1,25 (1,00; 1,72)	2,23 (1,55; 2,99)	1,63 * (1,11; 2,12)	71,57 (62,72; 87,26)	130,07** (99,88; 145,11)	125,76 (103,00; 144,49)	203,09** (144,54; 245,71)	125,56 107,44; 139,52)	234,39** (164,63; 276,24)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,05$ по сравнению с индивидуальным контролем.

Сопоставление ферментативной активности в нетрансформированных тканях края резекции (контроли) в зависимости от локализации проводили с использованием U критерия Манна-Уитни. Установили, что активность ТФк в 1,3 раза, а ГПО в 1,5 раза выше в нетрансформированных тканях легкого по сравнению со слизистыми желудка и кишечника (ЖКТ) ($p = 0,003$ как для ТФк, так и для ГПО). Согласно ранговому коэффициенту корреляции Спирмена имеется обратная негативная связь средней силы как для активности ТФк ($\rho = - 0,455$; $p = 0,002$), так и для ГПО ($\rho = -0,457$; $p = 0,002$) в слизистых ЖКТ в зависимости от локализации. Это также свидетельствует об их большей активности этих ферментов в легких, следовательно, о более высокой продукции в них 2-д-D-Риб. Возможно, что повышение активности ГПО параллельно с ТФк снижает риски развития эффектов 2-д-D-Риб. Поскольку помимо нейтрализации перекиси водорода (H_2O_2), восстановленный глутатион имеет решающее значение в детоксикации глиоксаля и других дикарбонилов, а также конечных продуктов гликирования (AGEs), уровни которых коррелируют с 2-д-D-Риб. Достоверных изменений активности остальных ферментов в нетрансформированных тканях в зависимости от локализации не выявлено. Установлена прямая связь средней силы между активностями ТФан и АДА ($\rho = 0,340$; $p < 0,024$) как в слизистых ЖКТ, так и в легких. Между активностями остальных ферментов достоверных корреляций не выявлено.

Особенности ферментативной активности в опухолях оценивали в сопоставлении с их индивидуальным контролем, используя непараметрический Т-критерий Вилкоксона. Установлено нарастание активности ферментов катаболизма нуклеозидов. Как в гомогенатах немелкоклеточного рака легких (НМКРЛ), так и аденокарцином желудка и кишечника (ЖКТ) активность ТФк была выше индивидуальных контролей в среднем в 1,8 раза ($p = 0,002$ при РЛ; $p = 0,001$ в опухолях ЖКТ). В гомогенатах НМКРЛ она была выше, чем в карциномах ЖКТ (U критерий Манна-Уитни = 111,50, $Z = 3,06$, $p = 0,002$). При сопоставлении с их индивидуальными патоморфологическими характеристиками данная особенность ТФк может быть связана с наличием обширных очагов некроза в опухолях НМКРЛ, зачастую развивавшихся на фоне антракоза легких. Активность АДА в НМКРЛ была выше активности в контроле в 1,7 раза, а в опухолях желудка и кишечника еще значительнее – в 1,9 раза ($p = 0,001$ как в РЛ, так и в опухолях ЖКТ). Следовательно, можно думать о повышении уровней метаболитов - продуктов их реакций, а именно, 2-дезокси-D-рибозо-1-фосфата (2-д-D-Риб-1-Ф), тимина и дезоксиинозина в исследуемых опухолях. Наряду с этим имелось параллельное повышение в этих же образцах тканей трансферазной активности ТФан в 1,6 раза по сравнению с их контролями ($p = 0,002$ при РЛ; $p = 0,001$ в опухолях ЖКТ). Известно, что донором 2-д-D-Риб может являться дезоксиинозин. О чем также свидетельствует усиление связи между активностями АДА и ТФан в опухолях ($\rho = 0,704$; $p < 0,001$). Вероятно, что повышение видов активности ТФ и АДА - универсальное свойство опухолей данных локализаций. В кооперации оба

фермента обеспечивают как продукцию 2-д-D-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина (дТД), необходимого для синтеза дезокситимидилата (дТМФ) по «запасному пути».

При исследовании особенностей опухолевой активности ферментов АОС в сопоставлении с их контролем достоверных изменений активности СОД не выявлено ($p = 0,41$ при РЛ; $p = 0,35$ в опухолях ЖКТ). Активность ГПО при этом имела тенденцию к снижению в среднем в 1,3 раза ($p = 0,01$ при РЛ; $p = 0,02$ в опухолях ЖКТ). Установлена негативная связь изменений активности фермента с патологией, также указывающая на ее снижение в опухолях ($\rho = -0,465$; $p < 0,05$). Известно, что активность ГПО коррелирует с уровнями функционального (восстановленного) глутатиона (ГТ) [5]. Редукция окисленного ГТ может быть лимитирована уровнями $НАДФН_2$, потребляемого опухолью при формировании дезоксирибонуклеотидов, при восстановлении дигидрофолата, образующегося в тимидилатсинтазной реакции параллельно с дТМФ и пр. Повышение потребности опухоли в глутатионе на фоне продукции 2-д-D-Риб и потребления глюкозы обусловлено его уникальными свойствами детоксикации AGEs, образующихся при усилении процессов гликирования. Также, возможно, что диссонанс между возросшими потребностями в глутатионе и отсутствием нарастания активности ГПО из-за его дефицита в опухолях легких, желудка, кишечника, могут быть связаны с ингибированием 2-д-D-Риб регуляторного фермента синтеза глутатиона – глутамил-цистеин лигазы [5].

Причем в карциномах желудка и кишечника активность ГПО была ниже, чем в карциномах НМКРЛ ($U = 112,00$, $Z = - 3,05$, $p = 0,002$). Следовательно, как и в норме, так и в гомогенатах НМКРЛ активности ТФк и ГПО выше, чем в опухолях желудка и кишечника. Между их активностями в гомогенатах опухолей выявлена прямая корреляция ($\rho = 0,376$; $p < 0,05$). Специфичность этих особенностей метаболизма в зависимости от локализации опухоли подтвердили по результатам рангового однофакторного анализа Крускалла-Уоллиса и медианного теста (χ^2). Так для активности ТФк значения критерия $H = 9,38$ ($p = 0,002$), ($\chi^2 = 9,09$; $p = 0,003$), для ГПО, соответственно, $H = 9,31$ ($p = 0,003$), ($\chi^2 = 9,09$; $p = 0,002$). Согласно результатам анализа для остальных ферментов особенности их опухолевой активности не зависели от ее локализации. Для СОД критерий $H = 3,35$ ($p = 0,067$), ($\chi^2 = 0,36$; $p = 0,547$). Для АДА: $H = 0,530$ ($p = 0,467$), ($\chi^2 = 0,36$; $p = 0,547$), для активности ТФан различия также недостоверны.

В опухолях на фоне повышения активности ТФк и АДА не наблюдалось повышения активности ГПО по сравнению с нетрансформированными контрольными тканями. Данный дисбаланс может способствовать как усилению процессов гликирования в опухолях, так и повышению уровней H_2O_2. В результате, развитие оксидативного стресса резонирует эффекты гликативного и карбонильного, сопровождающих опухолевую прогрессию.

ВЫВОДЫ

1. Нарастание видов активности ТФ и АДА в тканях НМКРЛ, аденокарциномах желудка и кишечника – универсальное свойство опухолей данных локализаций, обеспечивающее как продукцию 2-д-D-Риб-1-Ф, так и ресинтез дезокситимидина, необходимого для синтеза дезокситимидилата по «запасному пути».

2. Снижение активности ГПО на фоне нарастания 2-д-D-Риб в опухоли может способствовать усилению процессов гликирования и свободно-радикального окисления в опухолях. Это может способствовать формированию агрессивного фенотипа опухоли.

Список литературы / References:

1. Lee K.J., Yoo J.W., Kim Y.K., Choi J.H., Ha T.Y., Gil M. Advanced glycation end products promote triple negative breast cancer cells via ERK and NF-κB pathway. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2018, vol. 15, no. 495 (3), pp. 2195-2201.

2. Koh G., Yang E.J., Kim J.Y., Hyun J., Yoo S., Lee S.A. Intracellular glutathione production, but not protein glycation, underlies the protective effects of captopril against 2-deoxy-D-ribose-induced β-cell damage. *Mol. Med. Rep.,* 2015, vol. 12 (4), pp. 5314-5320.

3. Javaid S., Ishtiag M., Shaikh M., Hameed A., Choudhary M. Thymidine esters as substrate analogue inhibitors of angiogenic enzyme thymidine phosphorylase in vitro. *Bioorg. Chem.*, 2017, no. 70, pp. 44-56.

4. Vara D., Watt J.M., Fortunato T.M. [et al]. Direct Activation of NADPH Oxidase 2 by 2-Deoxyribose-1-Phosphate Triggers Nuclear Factor Kappa B-Dependent Angiogenesis. *Antioxid. Redox. Signal*, 2018, vol. 10, no. 28 (2), pp. 110-130.

5. Backos D.S., Fritz K.S., McArthur D.G. [et al.] Glycation of glutamate cysteine ligase by 2-deoxy-d-ribose and its potential impact on chemoresistance in glioblastoma. *Neurochem. Res.*, 2013, no. 38 (9), pp. 1838-1849.

6. Бакурова Е.М. Взаимосвязь активности тимидинфосфорилазы с индивидуальными особенностями пролиферации и ангиогенеза опухолей основных локализаций. *Новообразование (Neoplasm),* 2017, № 1 (16), с. 69-72. [Bakurova E.M. Interaction of thymidine phosphorylase activity with individual features of proliferation and angiogenesis of tumors of the main localizations. *Novoobrazovanie (Neoplasm)*, 2017, no. 1 (16), pp. 69-72. (In Russ.)]

7. Borzenko B.G., Bakurova E.M., Mironova K.A. A Double-Function of PD-ECGF/TP Protein that Predict Response to Target Chemotherapy. *Metabolomics*, 2015, 5:e136. doi:10.4172/2153-0769.1000e136.

8. Зуйков С.А., Борзенко Б.Г., Зуйкова О.В. Исследование соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем при опухолях кишечника. *Сибирский онкологический журнал*, 2014, № 2 (62), с. 24-27. [Zuikov S.A.,

Borzenko B.G., Zuikova O.V. The relation between prooxidant and antioxidant systems in the intestinal tumors. *Sibirian J. of Oncology*, 2014, no. 2 (62), pp. 24-27. (In Russ.)]

THE FEATURES OF TUMORAL 2-DEOXY-D-RIBOSE-1-PHOSPHATE GENERATION, ASSOCIATION WITH PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES

Bakurova E.M.
Maksim Gorky National Medical University
pr. Il'icha, 16, Donetsk, 83003, Ukraine; e-mail: 32023@ mail.ru

Abstract. A comparative study of the enzymes activity of thymidine, adenosine metabolism and the activity of antioxidant defense enzymes in tumors of different localizations was carried out. Aim: to evaluate the relevance of thymidine phosphorylase (TP), adenosine deaminase (ADA) in 2-deoxy-D-ribose (2-d-D-R-1-P) formation and their association with superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity in tumors. We demonstrated that tumor TP activity is higher by 1,8 times ($p = 0,002$), ADA activity is higher by 1,7-1,9 times ($p = 0,001$) as compared to non-neoplastic tissues of resection margin. The positive correlation between the intensity of TP and ADA activity was shown (the index of Spearman's rank correlation, i.e. $\rho = 0,704$; $p < 0,001$). So, tumors can increase the levels of 2-deoxy-D-ribose (2-d-D-R) and can stimulate of deoxythymidilate synthesis by the «salvage pathway» in one time. The nucleoside enzymes activity changes being accompanied by decrease of glutathione peroxidase activity in the tumors. Conclusion: It could be suggested that in cancers of different localizations the glycation by 2-d-D-R being associated with hydrogen peroxide formation. Here, we provide evidence on the impact and cooperation of glycative stress and oxidative stress in promoting human cancer progression.
Key words: *enzymes, 2-deoxy-D-ribose, hydrogen peroxide, cancer.*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СИГНАЛИНГА ПОЛИСАХАРИДОВ

Генералов Е.А.[1], Яковенко Л.В.[2]

[1] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

ул. Вавилова, 32, 119991, г. Москва, РФ; e-mail: generals1179@gmail.com

[2] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ленинские горы, 1, стр. 2, г. Москва, 119991, ГСП-1, РФ; e-mail: yakovenko.lv@physics.msu.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. В статье представлен обзор основных полисахаридных рецепторов – SR, CTLR, TLR, CR, NLR, LacCer. Описаны некоторые биологические активности полисахаридов, преимущественно – иммунологические, противоопухолевые, апоптотические, а также некоторые другие. Обсуждается роль рецепторов и моносахаридных последовательностей полисахаридов в регуляции иммунного ответа. Описаны возможные типы сигналинга и роль полисахаридов в нем. Рассмотрена возможность формирования метастабильных состояний клетки, возникающие за счет возникновения разнонаправленных внутриклеточных сигнальных каскадов при взаимодействии рецепторов и комплексных полисахаридных лигандов. Предполагается, что клетка, находящаяся в особом состоянии – бифуркационном, способна «совершать выбор» между различными типами ответов: апоптоз, пролиферация, арест клеточного цикла и другими. Приведены примеры активации различных сигнальных путей под действием полисахаридов, в том числе - возможности перехода трансформированных клеток в бифуркационное состояние.

***Ключевые слова**: полисахариды, гликаны, бифуркационное состояние, сигналинг, рецепторы.*

ВВЕДЕНИЕ

Большинство функций полисахаридов обусловлено их физико-химическими особенностями: моносахаридным составом (моносахаридными остатками, связывающимися с рецепторами клеток), типом гликозидной связи, третичной структурой, наличием или отсутствием ветвления и др. При этом большинство полисахаридов принимает участие в сигналинге, что и обуславливает большую часть их биологических активностей.

Сигналинг – процесс клеточного обмена информацией, который можно подразделить на три основных типа – межклеточный, внутриклеточный и рецепторный. Как и практически любой клеточный процесс, сигналинг может иметь положительные и отрицательные обратные связи, формирующиеся за счет накопления, трансформации и/или утилизации промежуточных молекул, к примеру – адаптерных белков.

В случае межклеточного сигналинга было обнаружено, что гликаны и их метаболизм влияют на адгезию лейкоцитов и плотность межклеточных контактов. Например, в ходе воспалительных реакций активация лейкоцитов происходит посредством последовательной клеточной адгезии и взаимодействия гликанов с контррецепторами. E-, P- и L-селектины, являющиеся гликопротеинами, опосредуют начальные реакции адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток, связываясь со своими контррецепторами, которые контролируются посттрансляционными модификациями [1].

Лектины взаимодействуют с гликанами с меньшим сродством, чем протеины друг с другом, но со значительной авидностью. Вместе с тем большинство лектинов связывают с высокой специфичностью различные гликановые фрагменты. В некоторых случаях концентрация гликанов в области гликокаликса может достигать миллимолярных концентраций. При этом их взаимодействие с лектиновыми рецепторами приводит к установлению весьма прочных межклеточных контактов. Связывание лектина может вызвать клеточную адгезию и агрегацию у примитивных многоклеточных организмов – губок. У млекопитающих лектиновые рецепторы, участвующие в межклеточных взаимодействиях, представлены селектинами, а их лиганды – гликаны, чаще всего содержат фукозные остатки, соединенные с тетрасахаридом CD15 на поверхности нейтрофилов (установление межклеточных контактов и участие в них гликанов представлено на рисунке 1) [1]. Гликозилирование также может модулировать клеточную адгезию у ранних эмбрионов млекопитающих, а потеря некоторых гликанов нарушает оплодотворение. При этом нарушения в процессе гликозилирования в клетке (нарушения в скорости, количестве гликанов или посттрансляционной модификации) приводит к ослаблению межклеточных контактов, что является причиной некоторых аутоиммунных заболеваний, болезни Гоше, Ниманна-Пика, Сандхоффа и Тей-Сакса [2].

Внутриклеточный сигналинг возникает в случае захвата клеткой патогена, содержащего полисахаридные эпитопы (при эндоцитозе, пиноцитозе или фагоцитозе). События внутриклеточного сигналинга частично можно описать рецепторным сигналингом. При этом рецепторы, расположенные на поверхности везикул могут связываться с моносахаридными последовательностями полисахаридов патогена. Например, в эндосомах присутствуют рецепторы TLR-4 тропные к гликопротеинам, Dectin-1 тропные к β-(1,3)-глюканам, MR тропные к последовательностям маннозы [4]. Вместе с тем некоторые рецепторы, например, TLR-4, на поверхности везикул и на поверхности цитоплазматической мембраны активируют различные сигнальные каскады [5].

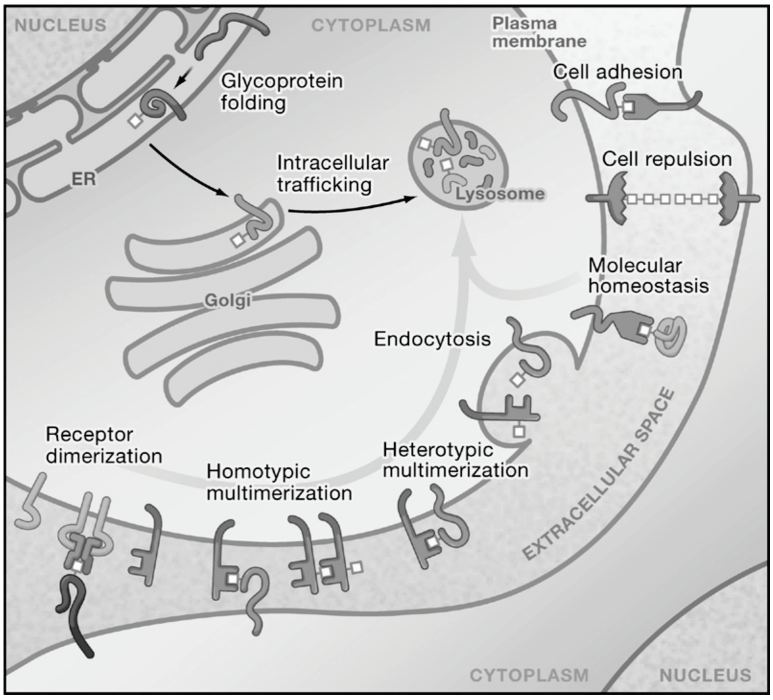


Рисунок 1. Влияние гликанов на межклеточные контакты [3]

Наиболее ярким примером рецепторного сигналинга можно считать действие молекулы зимозана – β-(1,3)-глюкана, который взаимодействует с рецепторами TLR-2/TLR-4 и Dectin-1, что приводит к торможению роста опухолевых клеток, стимуляции пролиферации спленоцитов и синтеза TNF, а также стимулирует иммунный ответ на такие патогены как *Staphylococcus aureus* [6-8]. Данные биологические эффекты обусловлены активацией NF-κB с последующим увеличением экспрессии генов провоспалительных факторов TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12. Вместе с тем возможна активация внутриклеточного сигнального каскада по каспазному пути CASP8 с участием адаптерных белков MyD88 и FADD, что приводит к апоптозу трансформированной клетки. Следует отметить, однако, что зимозан способен стимулировать экспрессию как про-, так и противовоспалительных цитокинов, например, в модели перитонита [9].

ПОЛИСАХАРИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Рецепторы, лигандами которых являются полисахариды, олигосахариды и моносахариды, чаще всего выступают в качестве защитных по той причине, что существует большое количество грибков, бактерий, вирусов и других патогенов, которые содержат в качестве эпитопа концевые последовательности из моно-, ди- или олигосахаридов.

Молекулы гликанов и, в частности, β-глюканов взаимодействуют с широким спектром мембранных рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток – моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, натуральных киллеров (NK) и нейтрофилов, приводя к активации различных сигнальных внутриклеточных каскадов. При этом связывание может быть как одиночным, так и совместным при участии различных рецепторов, что стимулирует и врожденный, и приобретенный иммунитет, а также фагоцитоз и секрецию цитокинов, что представлено на рисунке 2.

Ниже приводится небольшой список рецепторов, тропных к полисахаридам и моносахаридным последовательностям с кратким описанием биологической активности или активации экспрессии генов.

Толл-подобные рецепторы (TLR).

Толл-подобные рецепторы образуют одно из основных паттерн-распознающих и иммунокомпетентных семейств рецепторов. Рецепторы TLR могут быть представлены на поверхности цитоплазматических мембран или мембран лизосом и других везикул. При этом рецепторы TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6 и TLR-10 присутствуют только на цитоплазматической мембране, а TLR-3, TLR-7, TLR-8 и TLR-9 – ассоциированы с мембранами фагосом.

TLR рецепторы являются трансмембранными гликопротеинами 1 типа. В их структуру входит лиганд-связывающий LRR домен и сигнальный домен TIR, который состоит из центрального β-слоя, окруженного 5-ю α-спиралями, и отвечает за активацию адаптерных белков.

Сигнальная функция семейства толл-подобных рецепторов обусловлена обратимым фосфорилированием и убиквитинированием. При связывании лиганда происходят конформационные изменения рецептора, что приводит к димеризации рецепторов и гомотопическому связыванию гомодимерного или гетеродимерного комплекса TIR-TIR, входящий в состав TLR, и TIR в структуре какого-либо из адаптерных белков, (чаще всего MyD88, а также TRIF/TICAM-1, TIRAP/MAL и TRAM/TICAM-2/TIRP или их комбинации) [11]. Основной путь

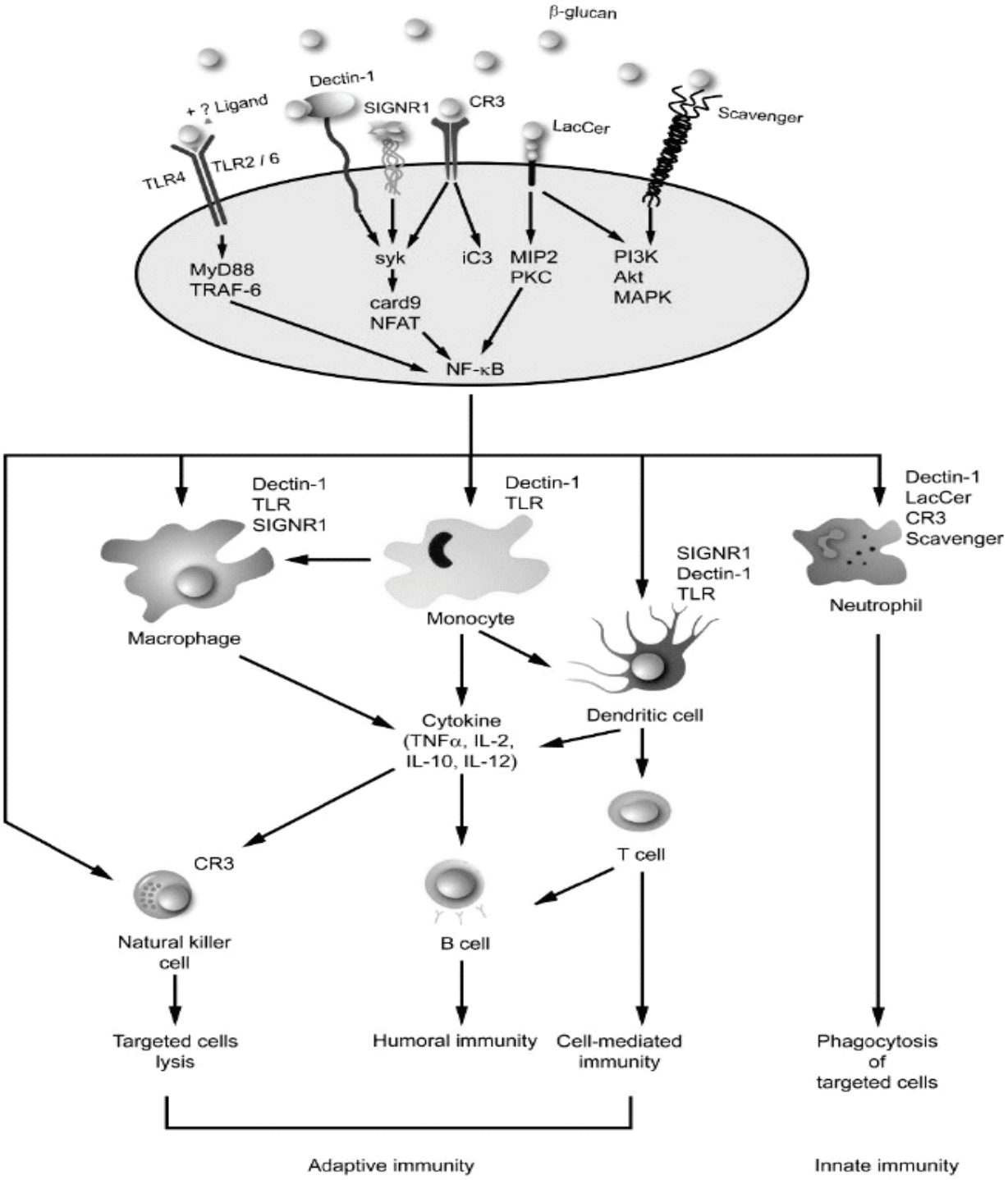


Рисунок 2. Биологические эффекты активации клеток β-глюканами посредством связывания с различными полисахаридными рецепторами на поверхности мембран [10]

активации иммунного ответа у рецепторов TLR семейства – по пути NF-κB посредством MyD88 адаптерного, в его реализации участвуют различные киназы: IRAK, TAK-1 и TBK-1/IKKi, и др. Однако существуют и альтернативные пути, например, через PI3K и TRIF, активация которых приводит либо к запуску апоптоза, либо к стимуляции выработки провоспалительных цитокинов и противовирусному иммунному ответу [12-14].

TLR специфичны к различного рода патогенам: бактериям, как грамположительным (TLR-1, TLR-6), так и грамотрицательным (TLR-4, TLR-5), вирусам (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9), простейшим и грибам (TLR-1, TLR-2, TLR-6). В настоящей работе из всего массива TLR рецепторов охарактеризованы только те, чьими лигандами являются полисахариды или их фрагменты: TLR-2, TLR-4, TLR-6.

Рецептор TLR-2 обладает самым широким спектром распознавания микробиологических молекул и, скорее всего, это связано не с его паттерн-распознающими способностями, а с его свойством димеризоваться с другими рецепторами, которые повышают аффинные способности димерного комплекса с TLR-2. Считается, что TLR-2 распознает пептидогликаны, липотейхоевые кислоты и липопротеины грамположительных бактерий, липоарабиноманнаны микобактерий, зимозан дрожжей и некоторые виды липополисахаридов (LPS) [15]. До

недавнего времени считалось, что TLR-2 участвует, в основном, только в передаче провоспалительных внутриклеточных сигналов. Однако было показано, что TLR-2 может участвовать в передаче гораздо более разнообразных сигналов, в том числе и противовоспалительных. Например, при стимуляции стафилококковыми препаратами пептидогликанов (PGN) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) продуцировали IL-10 через механизм, зависящий от рецептора TLR-2. Рекрутинг TLR-2 рецептора приводил к снижению уровня ответа Т-клеток на стафилококковые суперантигены. Дальнейшие исследования показали, что путь PI3K-Akt незаменим для производства IL-10, поскольку ответ IL-10 связан с фосфорилированием Akt и блокировался ингибитором PI3K вортманнином [16, 17].

Рецептор TLR-6, образующий димеры с TLR-2, связывает зимозан, который является β-(1→3)-глюканом. Более того, лигандами этого комплекса TLR-2/TLR-6 являются диациллипопептиды и триациллипопетиды, внешний поверхностный белок А из *Borrelia burgdorferi* (OspA-L), растворимый в феноле модулин, растворимый фактор туберкулеза (STF). Взаимодействие с комплексом TLR-6/TLR-2 приводит запуску внутриклеточного каскада по пути MyD88 и TRAF6, что приводит к активации NF-κB пути и секреции провоспалительных цитокинов клетками (чаще всего макрофагами) [18, 19]. Вместе с тем показано, что в целом, комплексы TLR2/1 в основном ассоциируются с провоспалительными ответами, а димеры TLR-2/TLR-6 – с противовоспалительными ответами [20, 21]. Данное наблюдение можно описать как рецепторный сигналинг, приводящий к бифуркационному состоянию клетки в отношении экспрессируемых цитокинов.

TLR-4 впервые был выделен в качестве основного рецептора LPS. В дальнейшем были обнаружены и другие лиганды TLR-4: маннан из *Saccharomyces cerevisiae*, глюкуроксиломаннан из *Cryptococcus neoformans*, гликоинозитолфосфолипиды из *Cruzi* T. и другие [22]. Для полноценного связывания TLR-4 с LPS требуется корецепторы MD-2 и CD14. Такое взаимодействие приводит к стимуляции экспрессии провоспалительных цитокинов. MD-2 связывается в соотношении 1:1 с внеклеточным доменом TLR-4 и непосредственно связывает LPS. После связывания происходит активация MyD88, TIRAP и TRAF6, а также активация экспрессии провоспалительных цитокинов по пути NF-κB при участии TICAM-1 [23]. Следует отметить, что сигналинг через TLR-4 приводит не только к провоспалительному ответу, но и противовоспалительному. Обнаружено, что некоторые растительные полисахариды, например из *Gingko biloba*, могут оказывать противовоспалительное действие при взаимодействии с TLR-4 [24].При этом одним из важнейших факторов выбора между про- и противовоспалительным ответом в клетке является расположение рецептора. Так TLR-4, расположенные в фагосоме активируют противовоспалительные каскады, а в цитоплазматической мембране – провоспалительные. Считается, что этот эффект зависит от изоформы p110δ PI3K киназы, участвующей в интернализации рецептора TLR-4 и влияющей на переключение между MyD88/MAL и TRIF-TRAM путями [5]. Учитывая доказанную дозовую зависимость между интернализацией и рецепторным сигналингом TLR-4 на примере LPS [25], можно предположить, что высокомолекулярные полисахариды с комплексной структурой вполне могут участвовать в формировании метастабильных состояний клетки, в которых она «будет делать выбор» между про- и противовоспалительным ответом.

Вместе с тем показано, что, например, полисахарид из *Ganoderma atrum* (PSG-1) проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* (за счет ингибирования пролиферации опухолевой линии саркомы S180) с помощью связывания TLR-4 и передачи внутриклеточного сигнала через NF-κB и MAPK [26]. При этом полисахарид, выделенный из *G.atrum* в той же лаборатории вызывает пролиферацию лимфоцитов и обладает иммуномодулирующим эффектов. Кроме того, PSG-1 активировал сигнальный путь NFAT и киназу PKC [27]. В свою очередь, наличие пролиферативной активности (так же как и ингибирующей активности) у полисахарида в одних клетках и ее отсутствие в других позволяет сделать предположение о различиях в рецепторном составе и о возможности регуляции клеточного ответа путем подбора концентраций активного вещества, которое может приводить к апоптозу или пролиферации. При этом в некотором диапазоне концентраций нетрансформированные клетки будут находиться в состоянии выбора «апоптоз-пролиферация», называемом бифуркационным.

НОД-подобные рецепторы (NLR).

NLR являются цитоплазматическими паттерн-распознающими белками и образуют второе важное семейство рецепторов в регуляции врожденного иммунитета. Всего известно 23 вида NLR у человека и 34 у мыши. Их подразделяют на 4 основных подсемейства: NLRA, NLRB NLRC (состоит из пяти рецепторов) и NLRP (состоит из 14 рецепторов), в зависимости от типа N-концевого домена [28].

В структуре всех NOD содержится CARD (каспаза-активирующий домен). NLRP подразделяются на группы по наличию пуринового домена. Оба вида доменов (пуриновые и CARD) позволяют взаимодействовать с адаптерными белками в результате обратимого гомотипического аутофосфорилирования. NOD также содержат С-концевой домен NACHT, ответственный за связывание лигандов. Оба структурных домена участвуют в олигомеризации после связывания патогена внутри клетки и образовании инфламмасомы, которая впоследствии активирует ферменты протеолитически активирующие IL-1β и другие цитокины [29]. Подсемейство NOD состоит из NOD1 и NOD2. NOD1 распознает структурные элементы грамотрицательных бактерий – дипептид D-γ-глутамил-мезо-ДАП (iE-DAP), а NOD2 – мурамил-дипептид. Адаптерным является серин-треониновый белок RIP2, который в активной форме снимает ингибирование NF-κB через убиквитирование IκBγ с участием убиквитинлигазы, cIAP1 и cIAP2 [30]. При этом цитозольные пептидогликановые рецепторы NOD1 и NOD2 необходимы для экспрессии IFN-γ NK-клетками. В отсутствие рецепторов NOD1 и NOD2 наблюдалась пониженная экспрессия IFN-γ после заражения *Salmonella enterica serovar Typhimurium* и *Listeria monocytogenes*

[31, 32]. Вместе с тем, установлено, что NOD1 участвует в распознавании и запуске иммунного ответа против микобактерий *Mycobacterium tuberculosis* у людей посредством активации синтеза провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8 и TNF-α [33].

При использовании полисахарида из *Astragalus membranaceus* (APS), были обнаружены его противовоспалительные свойства при использовании у больных с воспалительными заболеваниями кишечника, например, колита. Авторы установили, что APS взаимодействует и ингибирует NLRP3 рецептор. В результате чего, терапия APS приводила к нормализации массы тела мышей и снижала показатели активности болезни [34].

Полисахариды, сочетающие в себе структуры, тропные к рецепторам с про- и противовоспалительными свойствами, могут приводить к формированию бифуркационного состояния клетки. Это возможно, например, при взаимодействии фрагментов диссоциированных полисахаридов одновременно с NLRP3 и NOD1.

Лактозилцерамидный рецептор (LacCer).

LacCer является патоген-распознающим рецептором, присутствующим на поверхности мембран нейтрофилов и эндотелиальных клеток. Основные компоненты LacCer – длинные жирные кислоты C24:0 и C24:1, которые составляют основную часть молекулы гликосфинголипида. Кроме жирных кислот в его состав входят: гидрофобный церамид и гидрофильный сахарный фрагмент. Рецепторы формируют микродомены на плазматической мембране вместе с тирозинкиназой Lyn Src семейства и Gαi субъединицей гетеротримерного G-белка [35].

Лигандами лактозилцерамидных рецепторов являются β-(1→3)-глюканы. Было показано, что β-(1→3)-глюканы из *Pneumocystis carinii, Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* увеличивают синтез NF-kB, MIP-2 и TNF-α по пути через протеинкиназу C [36]. Установлено, что инактивация CR3 и LacCer антителами приводит к ингибированию нейтрофильного ответа на введение β-глюканов. При этом активация нейтрофилов при связывании LacCer глюканов стимулирует выработку активных форм кислорода (ROS) по пути MAPK и PI3K, с помощью которых происходит обезвреживание микробов [37]. Также опосредованно через связывание лактозилцерамидного рецептора в нейтрофилах регулируется хемотаксис (активация рецептора приводит к выделению хемоатрактанта IL-8) и секреция цитокинов, что приводит к усилению противомикробного действия нейтрофилов [38]. Например, PGG-глюкан - растворимый β-(1→6)-глюкан с β-(1→3) боковыми цепями, выделенный из дрожжей *Saccharomyces c.*, при связывании с мембранным фрагментом LacCer является иммуномодулятором, что выражается в стимуляции активации лейкоцитов по противоинфекционному механизму и пролиферации мегакариоцитов и миелоидных клеток [39].

Было показано, что связывание LacCer с полисахаридами *Acacia cyanophilla* и *Panax notoginseng* приводит к повышенной продукции ROS в нейтрофилах, что способствует активации противомикробного иммунитета [40]. Вместе с тем показано, что LacCer необходим для борьбы с микобактериями нейтрофилам и может связываться с липоарабиноманнанами, кэпированными маннозой [41].

Рецепторы-мусорщики (SR).

Рецепторы мусорщики являются, как и большинство рецепторов, мембранными гликопротеинами, в состав которых входят два трансмембранных, два внутриклеточных и один внеклеточный домен. Лигандами рецепторов этого типа являются полианионные соединения, липопротеины низкой и высокой плотности, а также окисленные или ацетилированные β-глюканы, к которым относятся зимозан, ламинарин, лентинан и карбоксиметил-β-(1→3)-глюкан. Однако для связывания зимозана и других β-глюканов в некоторых случаях требуется предварительная активация TLR-9, что может свидетельствовать об отсутствии специфичности SR к углеводам [42]. Взаимодействие рецепторов с лигандами приводит к передаче внутриклеточных сигналов посредством PI3K, MAPK и Akt киназы. По структуре SR подразделяются на классы A, B и C. Класс рецепторов A (также подразделяется на AI и AII) содержит коллаген-подобный домен, который отвечает за связывание лиганда. При этом AI связывает липополисахариды и липотейхоевые кислоты. После связывания происходит фагоцитирование лиганд-рецепторного комплекса с одновременной активацией адаптерных молекул и ядерных транскрипционных факторов. Совместное связывание лигандов SR-A с TLR-4 в свою очередь запускает активацию макрофагов через NF-κB путь [43].

Рецепторы системы комплемента (CR).

Рецепторы комплемента – это мембранные гликопротеиды, способные связываться с фрагментами и белками системы комплемента. Присутствуют на поверхности нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и B-лимфоцитов. Установлено, что из всего семейства рецепторов комплемента с полисахаридами, а именно β-глюканами, способен связываться только CR3.

Рецептор CR3 входит в семейство адгезионных интегринов. В своем составе имеет два домена – CD11b и CD18. У этого рецептора имеются два сайта связывания, один из которых расположен на C-конце и предназначен для β-глюканов, а второй, на N-конце – для связывания фрагмента системы комплемента iC3b, которое зависит от концентрации ионов Mg^{2+} [44].

Адгезионные свойства CR3 регулируются одновременным связыванием β-глюканов, например зимозана, и iC3b с рецептором. Событие связывания приводит к активации системы комплемента по классическому пути и обуславливает один из механизмов цитотоксичности иммунокомпетентных клеток [45, 46]. Рецептор CR3 участвует в противораковой активности, связанной с цитотоксичностью при опсонизации трансформированных клеток. Этот эффект был экспериментально продемонстрирован для β-(1→3)-(1→4)-глюканов, выделенных из ячменя и применяемых перорально, а также для WGP-глюкана, который процессируется макрофагами и доставляется ими в лимфоидные органы, где они связываются с гранулоцитами [47].

Лектин-подобные рецепторы С-типа (CTLR).

Рецепторы С-типа из семейства лектин-подобных рецепторов (CTL) изначально рассматривались как связывающие углеводы посредством углевод-распознающего домена (CRD), который за счет концевых аминокислотных последовательностей способен связываться с маннозами и галактозами в различных структурах с участием ионов Ca^{2+} и карбонильных групп, расположенных на специфических локусах CRD. На CRD имеется несколько сайтов, регулируемых кальцием, но для связывания карбогидратов основным является второй. При этом тип связываемой сахарной молекулы и место связывания на рецепторе зависит от аминокислотной последовательности. Так, например, галактоза распознается последовательностью Gln-Pro-Asp – рецептором ASGP-R, а манноза – Glu-Pro-Asn [48, 49]. Возможно распознавание маннозы рецепторами MR, которые совместно с рецепторами CD207 (дополнительно связываются с молекулами маннина, как и DC-SIGN [50]) и коллектинами распознают фукозу и N-ацетилглюкозамин [51]. Существует большое количество рецепторов (CTLD), имеющих в своем составе структуры, гомологичные CRD домену, поэтому они называются лектин-подобными рецепторами С-типа (CTLR). Основная петля углевод-связывающего домена плотно упакована и стабилизируется двумя сульфидными мостиками, что делает эту структуру консервативной. Более того, рецептор весьма распространен у животных и структурно, и функционально очень схож у мышей и людей: единственное отличие состоит в том, что рецептор этого типа у человека альтернативно сплайсированный [52].

В настоящее время к семейству CTL принято относить более тысячи различных рецепторов, которые подразделяются на 17 групп и которые могут связывать различные, не только полисахаридные, лиганды. Связывание приводит к активации различных клеток и запуску разного рода каскадов, за счет чего происходят: распознавание патогенных паттернов; регуляция гомеостаза; миграция кератиноцитов, способствующая заживлению ран [53]; регуляция иммунного ответа через изменения уровней цитокинов и хемокинов (TNF, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, CXCL02, CCL-3, GM-CSF и др. (54]); клеточная адгезия; фагоцитоз [55]. Рецепторы этой группы могут активировать различные сигнальные каскады, опосредуя мотивы ITAM, ITIM, DED и др.

Кластер Dectin-1 является V группой лектин-подобных рецепторов С-типа, которые содержат один домен CTLD, связанный с внутриклеточным сигнальным доменом посредством трансмембранного стержня. Каждый рецептор из этого кластера обладает своим сигнальным каскадом за счет наличия одного ITAM-подобного домена, ITIM домена и домена-эффектора смерти (DED) на внутриклеточной части рецептора. При этом их активность также связана с влиянием на натуральную совокупность генов киллеров (NKC). Рецептор Dectin-1 экспрессируется, в основном, на поверхности мембран миелоидных типов клеток: макрофагах, [56], нейтрофилах, дендритных клетках, которые являются основными в узнавании β-глюканов [57]. При этом рецептор Dectin-1 также представлен и в трансформированных клетках, например, в клеточных линиях рака молочной железы [58].

Связывание Dectin-1 с лигандом запускает различные клеточные ответы, а его расположение на иммунокомпетентных клетках и способность связывать глюканы предопределяет его роль в иммунной реакции на патогены. Рецептор позволяет эффективно активировать противогрибковый T_H-1-зависимый иммунитет и другие иммунные процессы [59].

Вместе с тем показано, что сигналинг через рецепторы Dectin-1 может приводить к экспрессии как про-, так и противовоспалительных цитокинов, включая TNF, IL-10, IL- 12, IL- 2, IL-6, IL-23 и TGFβ. Совместная активация TLR и Dectin-1 приводила к выбору между двумя типами клеточного ответа, влияя на полученный в результате адаптивный иммунитет [60, 61]. При этом по одной из гипотез ключевая роль в выборе клеточного ответа на полисахариды грибковой клеточной стенки принадлежит рецептору Dectin-1.

Dectin-1 распознает линейный или разветвленный 1,3-связанный β-глюкан, который вызывает внутриклеточную сигнализацию через, по меньшей мере, два пути, включая Syk-киназу и Raf-1, индуцируя продукцию нескольких цитокинов, включая IL-10 и TNF. В той же работе [61], авторы показали, что TLR распознают различные структуры грибковых клеточных стенок, в том числе маннозилированные, что приводит к сигналингу через MD-опосредованный путь NF-κB MyD88-Mal и индуцируют продукцию как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Совместная стимуляция обоих рецепторов может усиливать продукцию цитокинов, включая TNF, IL-23, IL-10 и IL-6, в то же время, снижая уровень продуцирования IL-12.

В кластер Dectin-2 входят рецепторы Dectin-2, BDCA-2, DCIR, DCAR, Clecsf8 и Mincle. Рецепторы этого типа обнаруживаются на мембранах клеток миелоидного и немиелоидного происхождения. В их состав входит один внеклеточный углеводный домен. Из всех рецепторов кластера только DCIR содержит цитоплазматический сигнальный мотив ITIM и обладает ингибирующей активностью. Остальные члены семейства – BDCA-2, Dectin-2, DCAR и Mincle – имеют цепь FcRγ, позволяющую индуцировать клеточную активацию, включая фагоцитоз и экспрессию цитокинов [62]. Показано, что Dectin-2 и Mincle действуют как рецепторы распознавания факторов патогенности грибов, а DCIR – как фактор прикрепления для капсидов ВИЧ к дендритным клеткам, то есть может быть использован в качестве мишени в антиретровирусной терапии [63].

Сложные молекулы, в том числе и полисахариды, проявляют разнородные биологические активности, что косвенно свидетельствует о взаимодействии с различными рецепторами. Тот факт, что полисахариды весьма гетерогенны и комплексны по своей структуре свидетельствует о возможности взаимодействовать с разнородными рецепторами, активация которых приводит к разнонаправленным и неоднозначным клеточным ответам: пролиферации, апоптозу, опосредованной экспрессии или репрессии генов, аресту клеточного цикла, хемотаксису и др. Выбор клеткой типа ответа происходит, когда она находится в особом, так называемом бифуркационном состоянии [64, 65]. В частности, была продемонстрирована возможность перехода

трансформированных клеток в бифуркационное состояние в ответ на внесение полисахарида. При этом противоопухолевые свойства не были обусловлены прямым цитотоксическим действием, а синтез TNF предопределялся наличием рецепторов Dectin-1 и TLR-2/TLR-6 [66]. При этом воздействие таких полисахаридов вполне может вызывать разнонаправленные биологические эффекты не только на клеточном уровне, но и, как следствие, на уровне организма. Так, например, цвиттерионные полисахариды могут модулировать иммунный ответ на патогены и способны быть как про- так и противовоспалительными агентами. Цвиттерионный полисахарид вызывал первичную активацию и стимуляцию дифференцировки по пути презентации комплексом MHCII полисахарида IL-17 Т-клеток, которые экспрессируют провоспалительные цитокины. Вместе с тем этот же полисахарид стимулировал IL-10 T-reg клеток, которые экспрессируют противовоспалительные цитокины [67].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе приведен обзор основных полисахаридных рецепторов и некоторых биологических эффектов полисахаридных лигандов. В настоящее время остается недостаточно изученным процесс формирования бифуркационного клеточного состояния. В силу большого разнообразия рецепторов и лигандов, в том числе полисахаридных, клеточные рецепторы могут взаимодействовать одновременно с молекулами, которые, в силу их структурных особенностей – разветвленности, гетерогенности, большой молекулярной массы и других – будут приводить к активации разнонаправленных внутриклеточных каскадов. Такие разнонаправленные клеточные сигналы потенциально приводят либо к метастабильному состоянию клетки, как в случае с полисахаридом из *Helianthus tuberosus* L. [66], либо к бифуркационному состоянию иммунной системы, как в случае цвиттерионных полисахаридов [67]. Для проверки этой гипотезы необходимо более детальное изучение структурных, концентрационных и других особенностей воздействия полисахаридов на клеточные системы. В случае подтверждения она открывает возможности для создания новых лекарственных препаратов, направленных на терапию аутоиммунных, инфекционных и онкологических заболеваний с минимальными побочными действиями.

Список использованной литературы / References:

1. Lowe J.B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. *Curr Opin Cell Biol.*, 2003, vol. 15, no. 5, pp. 531-538.

2. Lowe J.B., Marth J.D. A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003. vol. 72, pp. 673-691.

3. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 2006, vol. 126, no. 5, pp. 855-867.

4. Geier H., Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun*., 2011, vol. 79, no. 6, pp. 2204-2214.

5. Li J., Lee D.S., Madrenas J. Evolving bacterial envelopes and plasticity of TLR2-dependent responses: basic research and translational opportunities. *Frontiers in Immunology*, 2013, vol. 4, pp. 347.

6. Marakalala M.J., Williams D.L., Hoving J.C. [et al.] Dectin-1 plays a redundant role in the immunomodulatory activities of β-glucan-rich ligands *in vivo*. *Microbes Infect*., 2013, vol. 15, pp. 511-515.

7. Taghavi M., Mortaz E., Khosravi A. [et al.] Zymosan attenuates melanoma growth progression, increases splenocyte proliferation and induces TLR-2/4 and TNF-α expression in mice. *J. Inflamm*., 2018, vol. 15, no. 5, pp. 1-10, e-pub.

8. Dillon S., Agrawal S., Banerjee K. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest*., 2006, vol. 116, no. 4, pp. 916-928.

9. Sakashita Y., Hiyama E., Imamura Y. [et al.] Generation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the gut zymosan-induced peritonitis. Hiroshima *J. Med. Sci*., 2000, vol. 49, no. 1, pp. 43-48.

10. Chan G.C.-F., Chan W.K., Sze D.M.-Y. The effects of β-glucans on human immune and cancer cells. *J. of hem. and onc*., 2009, vol. 2, p. 25.

11. Toussi D.N., Massari P. Immune adjuvant effect of molecularly-defined Toll-Like receptor ligands. *Vaccines*, 2014, vol. 2, no. 2, pp. 323-353.

12. Kawai T., Akira S. Role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol*., 2010, vol. 11, no. 5, pp. 373–384.

13. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol*., 2014, vol. 426, no. 6, pp. 1246-1264.

14. Li X., Jiang S., Tapping R.I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*, 2010, vol. 49, no. 1, pp. 1-9, epub.

15. Oliveira-Nascimento L., Massari P., Wetzler L.M. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front. Immunol*., 2012, vol. 3, no. 79, pp. 1-17. Epub.

16. Buwitt-Beckmann U., Heine H., Wiesmuller K.H. [et al.] Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur. J. Immunol*., 2005, vol. 35, pp. 282-289.

17. Frodermann V., Chau T.A., Sayedyahossein S. [et al.] A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to Staphylococcus aureus. *J. Infect. Dis*., 2011, vol. 204, pp. 253-262.

18. Bulut Y., Faure E., Thomas L. [et al.] Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and Borrelia burgdorferi outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol*., 2001, vol. 167, no. 2, pp. 987-994.

19. Brown J., Wang H., Hajishengallis G.N., Martin M. TLR-signaling networks an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res*., 2011, vol. 90, no. 4. pp. 417-427.

20. Chau T.A., McCully M.L., Brintnell W. [et al.] Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome. *Nat. Med*., 2009, vol. 15, pp. 641-648.

21. Depaolo R.W., Tang F., Kim I. [et al.] Toll-like receptor 6 drives differentiation of tolerogenic dendritic cells and contributes to LcrV mediated plague pathogenesis. *Cell host microbe*, 2008, vol. 4, pp. 350-361.

22. Uematsu S., Akira S. Toll-like receptors (TLRs) and their Ligands. *Handb. Exp. Pharmacol*., 2008, vol. 183, pp. 1-20.

23. Tatematsu M., Yoshida R., Morioka Y. [et al.] Raftlin controls lipopolysaccharide-induced TLR4 internalization and TICAM-1 signaling in a cell type-specific manner. *J. Immunol*., 2016, vol. 196, no. 9, pp. 3865-3876.

24. Zhou X.-L., Yang M., Xue B.-G. [et al.] Anti-inflammatory action of Ginkgo Biloba leaf polysaccharide via TLR4/NF-κb signaling suppression. *Biomedical research*, 2014, vol. 25, no. 4, pp. 449-454.

25. Rajaiah R., Perkins D.J., Ireland D.D.C., Vogela S.N. Immunology and inflammation CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 27, pp. 8391-8396.

26. Zhang S., Nie S., Huang D., Huang J. [et al.] Polysaccharide from *Ganoderma atrum* evokes antitumor activity via Toll-like receptor 4-mediated NF-κB and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Agric. Food chem*., 2013, vol. 61, no. 15, pp. 3676-3682.

27. Yu Q., Nie S.-P., Wang J.-Q. [et al.] Signaling pathway involved in the immunomodulatory effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide in spleen lymphocytes. *J. Agric. Food chem*., 2015, vol. 63, no. 10, pp. 2734-2740.

28. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition be the innate immune system. *Int. Rev. Immunol*., 2011, vol. 30, pp. 16-34.

29. Rubino S.J., Selvanantham T., Girardin S.E., Philpott D.J. NOD-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr. Opin. Immunol*., 2012, vol. 24, pp. 398-404.

30. Schneider M., Zimmermann A.G., Roberts R.A. [et al.] The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-κB. *Nat. Immunol*., 2006, vol. 6, pp. 9-20.

31. Selvanantham T., Escalante N.K., Cruz Tleugabulova M. [et al.] NOD1 and NOD2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. *The Journal of immunology*, 2013, vol. 191, no. 11, pp. 5646-5654.

32. Franchi L., Warner N., Viani K., Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev*., 2009, vol. 227, no. 1, pp. 106-128.

33. Juárez E., Carranza C., Hernández-Sánchez F. [et al.] Nucleotide-oligomerizing domain-1 (NOD1) receptor activation induces pro-inflammatory responses and autophagy in human alveolar macrophages. *BMC Pulm. Med*., 2014, vol. 14, no. 152. pp. 1-11, epub.

34. Tian Z., Liu L., Yang B. Astagalus polysaccharide attenuates murine colitis through inhibiton of the NLRP3 inflammasome. *Planta medica*, 2016, vol. 83, no. 1, pp. 70-77.

35. Iwabuchi K., Nakayama H., Oizumi A. [et al.] Role of Ceramide from glycosphingolipids and its metabolites in immunological and inflammatory responses in humans (Review). *Mediators of Inflammation*, 2015, vol. 2015, pp. 1-10.

36. Evans S.E., Hahn P.Y., McCann F. [et al.] Pneumocystis cell wall β-glucans stimulate alveolar epithelial cell chemokine generation through nuclear factor-κB–dependent mechanisms. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*., 2005, vol. 32, no. 6, pp. 490-497.

37. Iwabuchi K., Nagaoka I. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood*, 2002, vol. 100, pp. 1454-1464.

38. Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E. Effects of β-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 2007, vol. 43, pp. 597-606.

39. Legentil L., Paris F., Ballet C. [et al.] Molecular interactions of β-(1→3)-glucans with their receptors. *Molecules*, 2015, vol. 20, pp. 9745-9766.

40. Popa V. *Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Applications.* Smithers Rapra, 2011, 408 p.

41. Nakayama H., Kurihara H., Morita Y.S. [et al.] Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci. Signal*, 2016, vol. 9, ra101, pp. 1-15.

42. Rice P.J., Kelley J.L., Kogan G. [et al.] Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-β-d-glucans. *J. Leukoc. Biol*., 2002, vol. 72, pp. 140-146.

43. Yu H., Ha T., Liu L. [et al.] Scavenger receptor A (SR-A) is required for LPS-induced TLR4 mediated NF-κB activation in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1823, no. 7, pp. 1192-1198.

44. Větvička V., Novák M. *Biology and chemistry of beta glucan: beta glucans – mechanisms of action*. Bentham science publishers, 2011, 83 p.

45. Li B., Allendorf D.J., Hansen R. [et al.] Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Immunol*, 2006, vol. 177, no. 3, pp. 1661-1669.

46. Yan J., Allendorf D.J., Li B. [et al.] The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy. *Advances in experimental medicine and biology*, 2008, vol. 8, no. 3, pp. 218-225.

47. Hong F., Yan J., Baran T.J. [et al.] Mechanism by which orally administered β-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *The journal of immunology*, 2004, vol. 173, pp. 797-806.

48. Zelensky A.N., Gready J.E. The C-type lectin like domain superfamily. *The FEBS J*., 2005, vol. 272, pp. 6179-6217.

49. Sancho D., Reise e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Ann. Rev. Immunol*., 2012, vol. 30, pp. 491-529.

50. Hong W.-P.P., Nguyen S., Young S. [et al.] Identification of the Optimal DC-SIGN Binding Site on Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120. *J. Virol*., 2007, vol. 81, no. 15, pp. 8325-8336.

51. Hollmig S.T., Ariizumi K., Cruz D.P. Recognition of non-self-polysaccharides by C-type lectin receptors dectin-1 and dectin-2 Jr. *Glycobiology*, 2009, vol. 19, no. 6, pp. 568-575.

52. Ruiz-Herrera J. *Dimorphic fungi: their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis*. Bentham Science Publishers, 2012, 150 p.

53. van den Berg L.M., Zijlstra-Willems E.M., Richters C.D. [et al.] Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelization. *Cellular immunology*, 2014, vol. 289, pp. 49-54.

54. Brown G.D. Dectin-1: A signaling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol*., 2006, vol. 6, pp. 33-44.

55. Huysamen C., Brown G.D. The fungal pattern-recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin like receptors. *FEMS Microbiol. Lett*., 2009, vol. 290, pp. 121-128.

56. Kimberg M., Brown G.D. Dectin-1 and its role in antifungal immunity. *Medical mycology*, 2008, vol. 46, no. 7, pp. 631-636.

57. Kerrigan A.M., Brown G.D. Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends immunol*., 2011, vol. 32, pp. 151-156.

58. Chen H., Cai H., Chen L. [et al.] H. N-glycan-defective breast cancer cells induce a phenotypic switch in polarization of bone marrow-derived macrophages. *Clin. Invest. Med*., 2011, vol. 34, no. 2, pp. 71-81.

59. Hardison S.E., Brown G.D. C-type lectin orchestrate antifungal immunity. *Nat. immunol*., 2012, vol. 13, pp. 817-822.

60. Dennehy K.M., Ferwerda G., Faro-Trindade I. [et al.] Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur. J. Immunol*., 2008, vol. 38, no. 2, pp. 500-506.

61. Reid D.M., Gow A.R.N., Brown G.D. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr. Opin. Immunol*., 2009, vol. 21, no. 1, pp. 30-37.

62. Kerscher B., Willment J.A., Brown G.D. The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update. *Int. Immunol*., 2013, vol. 25, no. 5, pp. 271-277.

63. Lambert A.A., Gilbert C., Richard M. [et al.] The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood*, 2008, vol. 112, no. 4, pp. 1299-1307.

64. Laura A.A., Luke Y.P., Krasimira T.-A. Bifurcation analysis of a two-compartment hippocampal pyramidal cell model. *J. Comput. Neurosci*., 2016, vol. 41, pp. 91-106.

65. Otte S., Berg S., Luther S., Parlitz U. Bifurcations, chaos, and sensitivity to parameter variations in the Sato cardiac cell model Author links open overlay panel. *Communications in nonlinear science and numerical simulation*, 2016, vol. 37, pp. 265-281.

66. Generalov E.A., Levashova N.T., Sidorova A.E. [et al.] An autowave model of the bifurcation behavior of transformed cells in response to polysaccharide. *Biophysics*, 2017, vol. 62, no. 5, pp. 717-721.

67. Stephen T.L., Groneck L., Kalka-Moll W.M. The modulation of adaptive immune responses by bacterial zwitterionic polysaccharides. *International journal of microbiology*, 2010, vol. 2010, pp. 1-12, epub.

BIOLOGICAL EFFECTS OF POLYSACCHARIDES SIGNALING

Generalov E.A.[1], Yakovenko L.V.[2]
[1] Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences
119991, Moscow, Russia; e-mail: generals1179@gmail.com
[2] M.V. Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 1-2, Moscow, 119991, Russia; e-mail: yakovenko.lv@physics.msu.ru

Abstract. This article provides an overview of the main polysaccharide receptors – SR, CTLR, TLR, CR, NLR, LacCer. Some biological activities of polysaccharides, mainly immunological, antitumor, apoptotic, and some others also are described. The role of receptors and monosaccharide sequences of polysaccharides in the regulation of the immune response is discussed. Possible types of signaling and the role of polysaccharides in it are described. The possibility of formation of metastable states of the cell arising due to the appearance of multidirectional intracellular signaling cascades in the interaction of receptors and complex polysaccharide ligands is considered. It is assumed that a cell in a special state - a bifurcation one - is capable of "making a choice" between different types of responses: apoptosis, proliferation, cell cycle arrest, and others. Examples are given, including the possibility of transition of transformed cells into a bifurcation state in response to polysaccharide introduction into cell cultures.
Key words*: polysaccharides, glycans, bifurcation state, signaling, receptors.*

ПРАЙМИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Григорьева Д.В.[1], Терехова М.С.[1], Шамова Е.В.[1], Ефремов Н.А.[2], Малюшкова Е.В.[1], Семак И.В.[1], Черенкевич С.Н.[1], Соколов А.В.[3], Панасенко О.М.[4], Горудко И.В.[1]

[1] Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Республика Беларусь; e-mail: dargr@tut.by
[2] ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»
агрогородок Лесной, Минский район, 223040, Республика Беларусь; e-mail: hakumen737@gmail.com
[3] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
ул. Академика Павлова, 12, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ; e-mail: biochemsokolov@gmail.com
[4] ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России
ул. Малая Пироговская, 1а, г. Москва, 119435, РФ; e-mail: o-panas@mail.ru
Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Установлено, что рекомбинантный лактоферрин человека (рЛф), выделенный из молока трансгенных коз, связывается с нейтрофилами периферической крови человека. Данное связывание ведет к увеличению внутриклеточной концентрации свободных ионов кальциях за счет мобилизации Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и входа внеклеточных Ca^{2+} через депо-управляемые кальциевые каналы и кальциевые каналы Т-типа, фосфорилированию внутриклеточных белков по тирозину, а также к реорганизации актинового цитоскелета. Показано, что рЛф праймирует fMLP-индуцированный респираторный взрыв нейтрофилов. Полученные данные свидетельствую о том, что рЛф является перспективным белком с иммуномодулирующим действием, направленным на повышение функциональной активности нейтрофилов при патологиях, ассоциированных со сниженной киллерной способностью этих клеток.
Ключевые слова: *рекомбинантный лактоферрин человека, нейтрофилы, респираторный взрыв, ионы кальция, тирозинкиназы, актиновый цитоскелет.*

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в современной науке значительно повысился интерес к изучению роли железосвязывающего белка лактоферрина (Лф), обладающего уникальным набором биологических функций различного характера. Изначально Лф рассматривался исключительно как белок, проявляющий бактериостатические действие за счет связывания ионов железа и других металлов, что лишает бактериальные клетки важных микроэлементов, необходимых для их роста [1]. Однако в дальнейшем были выявлены бактерицидное, антиканцерогенное, противовоспалительное, иммуномодулирующее и другие свойства Лф [2]. Лф экспрессируется эпителиальными клетками внутренних желез млекопитающих с последующей секрецией белка на слизистую или в другие жидкости, а также синтезируется и накапливается во вторичных гранулах нейтрофилов. Как известно, наиболее многочисленную популяцию лейкоцитов периферической крови у взрослого человека составляют как раз нейтрофильные гранулоциты. Нейтрофилы являются клеточным компонентом врожденного иммунитета [3]. При дегрануляции или лизисе клеток Лф высвобождается во внеклеточное пространство. В связи с этим Лф относят к белкам острой фазы воспаления, увеличение его концентрации в крови либо других жидкостях служит в качестве маркера течения воспалительной реакции в организме. Концентрация Лф в плазме зависит от количества нейтрофилов. Поскольку 10^6 нейтрофилов содержат 15 мкг Лф, а в очагах воспаления концентрация данных клеток варьируется от 25×10^6 кл/мл до 5×10^7 кл/мл, то локальная концентрация Лф может достигать 750 мкг/мл. При активации дегрануляции нейтрофилов высвобождающийся из гранул Лф может связываться с клетками, находящимися в ближайшем микроокружении нейтрофилов в очаге воспаления, а именно с макрофагами, лимфоцитами, тучными клетками и базофилами [4]. Однако помимо этого, Лф также может связывается с поверхностью самих нейтрофилов и регулировать их структурно-функциональное состояние. К настоящему времени установлено, что Лф усиливает адгезию нейтрофилов к эндотелию [5], а также задерживает апоптоз нейтрофилов [6]. Однако как влияет Лф на проявление других функциональных активностей нейтрофилов, а именно продукцию активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ), секрецию антимикробных гранулярных белков, способность образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки и другие – неизвестно. Поэтому целью данной работы явилось исследование влияние Лф на респираторный взрыв нейтрофилов, а также выяснение механизмов, оказываемых Лф эффектов.

В исследовании использовали рекомбинантный Лф (рЛф) человека, выделенный из молока трансгенных коз-продуцентов. В работе [7] было показано, что рЛф по физическим, биохимическим и биологическим характеристикам аналогичен природному Лф человека из женского молока, что делает его перспективным соединением для использования в пищевой, фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нейтрофилы выделяли из донорской крови, стабилизированной 109 мМ раствором цитрата натрия, полученной из Республиканского научно-практического центра гематологии и медицинских биотехнологий (г. Минск, Республика Беларусь). Кровь смешивали с 6 %-ным раствором декстрана Т70 (5:1, v/v) в 0,9 %-ном NaCl и осаждали клеточную массу в течение 30-40 мин при 23 °С с использование пластиковых шприцов. Слой плазмы, обогащенной лейкоцитами, собирали в пластиковые пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 *g*, после чего примесь эритроцитов удаляли осмотическим лизисом, добавляя к осадку клеток сначала 3 мл 0,2 %-ного NaCl, а затем столько же 1,6 %-ного NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 400 *g*. Осадок клеток ресуспензировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 10 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (pH 7,35), наслаивали на 3 мл лимфопрепа и центрифугировали в течение 10 мин при 400 *g*. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ в течение 7 мин при 400 *g*. Отмытые нейтрофилы ресуспензировали в ФСБ с глюкозой (2 мг/мл) и хранили при 4 °С в течение 6-8 часов. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97-98 %, число жизнеспособных клеток по тесту с пропидиум иодидом – не менее 96 %.

Связывание рЛф с нейтрофилами оценивали методом проточной цитофлуориметрии. 100 мкл цельной крови инкубировали с рЛф (250 мкг/мл), меченным флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), в течении 10 мин при 23 °С, затем клеточную суспензию прокрашивали меченным антителом CD45-PC5 к общелейкоцитарному антигену (трансмембранному гликопротеину), представленному на поверхности всех лейкоцитов человека, в течение 15 мин при 23 °С. Эритроциты лизировали 1 мл Versalyse Lysing Solution в течение 10 мин при 23 °С, после чего полученная суспензия клеток была проанализирована на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter). Анализ уровня экспрессии CD45 в сочетании с боковым светорассеянием (SSC/CD45) позволил разделить лейкоциты по гранулярности и выявить фракцию нейтрофилов.

Продукцию H_2O_2 нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре СМ 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием скополетина. Скополетин является флуоресцентным субстратом пероксидазы хрена, при окислении которого в присутствии H_2O_2 образуется нефлуоресцирующий продукт. К 1 мл суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл в ФСБ с 1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$, 37 °С), содержащей 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы хрена и 1 мМ NaN_3 добавляли рЛф (250 мкг/мл), а затем, при отсутствии влияния последнего, fMLP (1 мкМ). Кинетику окисления скополетина регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции на длине волны 460 нм (возбуждение на длине волны 350 нм). Скорость продукции H_2O_2 клетками определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой, отражающей убыль интенсивности флуоресценции скополетина в результате его окисления H_2O_2.

Дегрануляцию специфических гранул нейтрофилов оценивали по выходу из клеток лизоцима – фермента, содержащегося в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов. К суспензии нейтрофилов в ФСБ, содержащем 1 мМ $CaCl_2$ и 0,5 мМ $MgCl_2$, добавляли рЛф (25-500 мкг/мл) и инкубировали образцы в течение 20 мин при 37 °С. Конечная концентрация клеток в пробах составляла 3×10^6 кл/мл. Реакцию дегрануляции останавливали путем помещения образцов на лед и последующим центрифугированием в течение 8 мин при 2500 *g*. Полученные супернатанты использовали для регистрации активности лизоцима, которую определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus.* Анализируемую пробу (100 мкл) добавляли к 900 мкл суспензии *M. lysodeikticus* в 0,1 М Na_2HPO_4/KH_2PO_4 буфере (pH 6,2) и при 37 °С регистрировали изменение оптической плотности полученной суспензии на длине волны 450 нм с применением компьютеризированного спектрофотометра РВ 2201 («СОЛАР», Минск, Беларусь). Активность лизоцима определяли по тангенсу угла наклона линейного участка полученных экспериментальных кривых.

Внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в нейтрофилах определяли с применением флуоресцентного зонда фура 2-АМ. К 1 мл (10^7 кл/мл) отмытых нейтрофилов в HEPES-буфере, содержащем 4,4 мМ $MgSO_4$, 1,7 мМ $CaCl_2$, добавляли 2 мкл 0,5 мМ фура 2-АМ и инкубировали в течение 40 мин при 37 °С и постоянном перемешивании. Нагруженные зондом клетки отмывали от инкубационной среды дважды HEPES-буфером в течение 5 мин при 400 *g*. Отмытые нейтрофилы сохраняли в качестве исходной суспензии в концентрации 10^7 кл/мл. Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ в кювету спектрофлуориметра вносили 0,9 мл HEPES-буфера, содержащего 4,4 мМ $MgSO_4$, 1,7 мМ $CaCl_2$ и 100 мкл исходной суспензии клеток. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на длине волны 510 нм (возбуждение флуоресценции – 340 нм и 380 нм) при 37 °С в кинетическом режиме с использованием спектрофлуориметра СМ 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь). Концентрацию цитоплазматического кальция рассчитывали по известной методике [8].

Структурную организацию актинового цитоскелета в нейтрофилах изучали методом лазерной конфокальной микроскопии (конфокальный микроскоп NanoFinder 30, Tokio Instruments). Для приготовления препаратов суспензию нейтрофилов в концентрации 10^7 кл/мл в ФСБ, содержащем 1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$, инкубировали 15 мин с рЛф (250 мкг/мл). Затем клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и через 10 мин отмывали ФСБ. Отмытые клетки наносили на поверхность покровных стекол, покрытых поли-L-лизином. Через 30 мин образцы промывали 3 раза ФСБ. Покровные стекла с нейтрофилами инкубировали 5 мин с 0,1 % тритоном Х-100 для пермеабилизации мембран, затем образцы отмывали 3 раза в ФСБ и проводили визуализацию F-актина. Для этого покровные стекла с нейтрофилами инкубировали 40 мин с фаллоидином – высокоафинным зондом на фибриллярный актин (F-актин), конъюгированным с Alexa Fluor 488, (0,165 мкМ), после чего стекла отмывались

от избытка флуоресцентного зонда ФСБ (2 раза по 10 мин) и дистиллированной водой (1 раз 10 мин). Покровные стекла с нейтрофилами монтировали на предметные стекла, обезжиренные 96 % спиртом, с использованием полимеризующейся смолы для флуоресцентной микроскопии. Для возбуждения флуоресценции флуоресцеинтного зонда использовали лазер с длиной волны 473 нм, для детекции флуоресценции использовали фильтры 505-535 нм. Получение и обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «NanoFinder Data Viewer».

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием программного пакета Origin 7.0. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий между значениями среднего рассчитывали по критерию Стьюдента, считая различия достоверными при уровне значимости $p<0,05$. Кинетические кривые представлены как типичные для серии из 5-7 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения способности рЛф связываться с нейтрофилами был применен метод проточной цитофлуориметрии, позволяющий непосредственно визуализировать связывание белка, меченного флуорофором, с плазматической мембраной клетки. С использованием FITC-меченного рЛф показано (рис. 1), что рЛф связывается с поверхностью лейкоцитов, в том числе и с нейтрофилами.

Далее нами было исследовано влияние рЛф на активацию НАДФН-оксидазы нейтрофилов, регистрируемую флуоресцентным методом по окислению скополетина пероксидазой хрена в присутствии образующегося при респираторном взрыве H_2O_2. Как видно из данных, представленных на рисунке 2, рЛф не влиял на продукцию H_2O_2 клетками в базальных условиях (без агониста), однако усиливал fMLP-индуцированный респираторный взрыв нейтрофилов. Так, в присутствии рЛф (250 мкг/мл) скорость окисления скополетина в суспензии fMLP-активированных нейтрофилов увеличивалась на 33±7 %.

Нейтрофилы в организме, как правило, подвергаются параллельному и/или последовательному воздействию интермедиатов, их активация чаще всего происходит на фоне измененного, "праймированного", состояния. Праймирующий стимул вызывает метаболическую перестройку, не приводящую к активации клетки, следствием его влияния является усиление ответа на последующую активацию [9]. Судя по всему, рЛф является праймирующим агентом для нейтрофилов.

В зависимости от рецептора, через который действует праймирующий агент, могут реализовываться разные механизмы праймирования нейтрофилов: изменения в уровне экспрессии адгезивных молекул на поверхности клетки, высвобождение содержимого гранул, полимеризация актина, фосфорилирование белков, синтез белка *de novo*, модуляция внутриклеточной концентрации ионов кальция, активация фосфолипаз, образование биоактивных липидов и пр. [10]. Отвечая более выраженной реакцией, праймированные нейтрофилы не только выполняют свое физиологическое назначение (оно связано с подготовкой к экстренному выходу из сосудов и уничтожению фагоцитарных объектов), но и включаются в патологическое воспаление – развитие ревматоидного артрита, сепсиса и пр. [11]. В связи с этим изучение внутриклеточных сигнальных систем, вовлеченных в праймирование, поможет раскрыть механизмы, которыми регулируются специфические функции нейтрофилов, и развить терапевтические стратегии, направленные на подавление чрезмерной цитотоксичности нейтрофилов.

Как правило, праймирование НАДФН-оксидазного комплекса ассоциировано с различными изменениями в клетке, включающими частичное фосфорилирование p47phox, конформационные изменения комплекса p47phox/p40phox/p67phox и транслокацию цитохрома b558 из внутриклеточных гранул на плазматическую

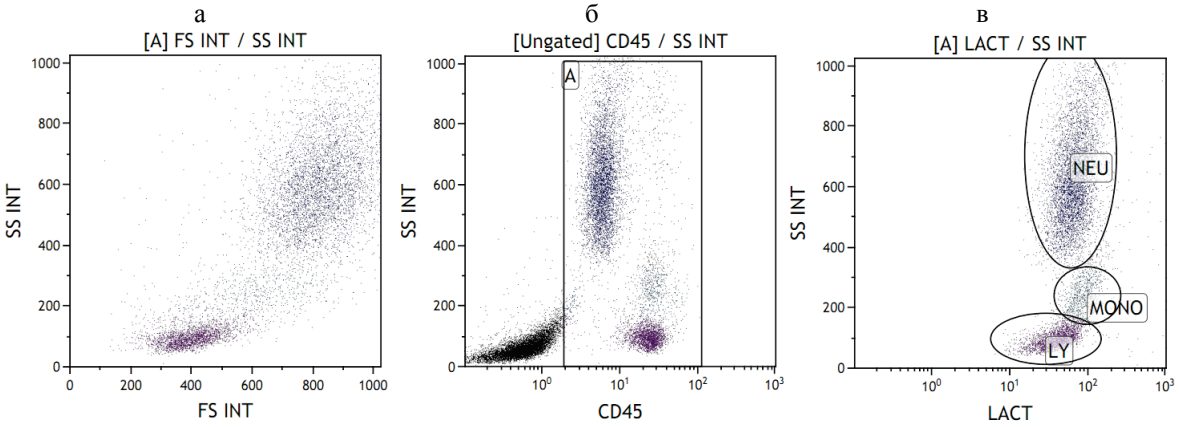


Рисунок 1. Связывание рЛф с нейтрофилами: а – диаграмма бокового-прямого (SS-FS) светорассеяния для суспензии лейкоцитов крови: по оси абсцисс – малоугловое светорассеяние, характеризующее размер клеток, по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру клеток; б – гистограмма распределения CD45 на лейкоцитах периферической крови; в – гистограмма распределения рЛф-FITC на лейкоцитах периферической крови

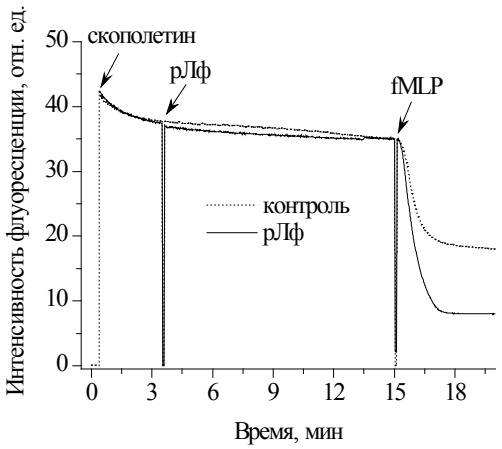


Рисунок 2. Типичные кинетические кривые окисления скополетина (1 мкМ) в суспензии нейтрофилов (1×10^6 кл/мл), активированных fMLP (1 мкМ) в отсутствие и в присутствии рЛф (250 мкг/мл)

мембрану посредством экзоцитоза содержимого гранул нейтрофилов [12]. В нейтрофилах в состоянии покоя лишь 15 % субъединиц цитохрома b558 (gp91phox и p22phox) локализованы в плазматической мембране, оставшиеся 85 % – в мембране специфических гранул и секреторных везикул. Одной из стадий процесса дегрануляции является контакт внешней поверхности липидного бислоя мембраны, окружающей гранулу, с внутренней поверхностью плазматической мембраны с последующим полным слиянием гранулы с плазматической мембраной [13]. Нами было показано, что рЛф в концентрациях, характерных для очаговвоспаления, инициирует дегрануляцию специфических гранул нейтрофилов, регистрируемую по высвобождению во внеклеточную среду лизоцима – фермента, содержащегося в азурофильных и специфических гранулах клеток. Так, при действии рЛф в физиологических концентрациях (вплоть до 100 мкг/мл) экзоцитоз лизоцима не регистрировался, при добавлении рЛф в концентрациях 250 мкг/мл и 500 мкг/мл выход лизоцима увеличивался на 21±4 % и 55±5 %, соответственно, по сравнению с выходом белка в контроле. Стимуляция дегрануляции специфических гранул при действии рЛф, по всей видимости, способствует также увеличению содержания цитохрома b558 в плазматической мембране нейтрофилов, что является одним из возможных механизмов прайминга респираторного взрыва нейтрофилов при действии рЛф.

Важную роль в праймировании нейтрофилов играют ионы кальция [14]. Так, активация многих ферментов, участвующих в регуляции респираторного взрыва (например, протеинкиназы С, митоген-активируемых протеинкиназ и др.), зависит от цитозольных Ca^{2+} и не происходит в их отсутствие. В работе [15] показано, что праймирующий эффект липополисахаридов зависит от внутриклеточных Ca^{2+} и блокируется их хелаторами. Finkel T.N. с соавторами впервые обнаружили нейтрофил-праймирующую активность кальций-специфического ионофора, иономицина [16]. Поэтому далее нами было исследовано влияние рЛф на изменение концентрации цитозольных ионов кальция в нейтрофилах. На рисунке 3а приведены типичные кинетические кривые рЛф-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Видно, что с увеличением концентрации рЛф в среде пик увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках увеличивался (рис. 3б).

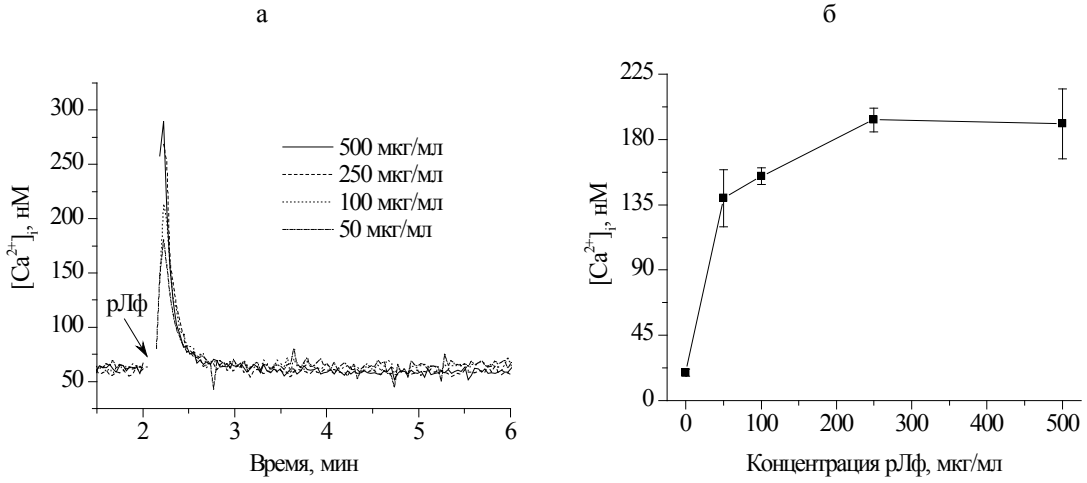


Рисунок 3. Влияние рЛф на Ca^{2+}-сигнализацию в нейтрофилах: а – типичные кинетические кривые изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах в Ca^{2+}-содержащей среде при действии рЛф в различных концентрациях; б – зависимость увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах от концентрации добавленного рЛф

Поскольку увеличение $[Ca^{2+}]_i$ может быть обусловлено высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо и/или поступление внеклеточных Ca^{2+} в клетку через каналы плазматической мембраны [17], далее нами были идентифицированы пути увеличения концентрации цитоплазматических Ca^{2+} в нейтрофилах при действии рЛф. Как видно из данных, представленных на рисунке 4, добавление рЛф к суспензии нейтрофилов в бескальциевой среде, содержащей 1 мМ ЭДТА – хелатор внеклеточных Ca^{2+}, вызывало значительно меньшее увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах по сравнению с эффектом рЛф в Ca^{2+}-содержащей среде. В нейтрофилах большая часть высвобождаемых из внутриклеточных депо Ca^{2+} запасена в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и митохондриях, число которых в зрелых нейтрофилах мало. РЛф, добавленный к суспензии нейтрофилов в бескальциевой среде, проинкубированных с тапсигаргином (ТГ) (2 мкМ) – блокатором Ca^{2+}-АТФазы ЭР, не вызывал увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в клетках. Таким образом, мобилизация Ca^{2+} из ЭР вносит лишь ~20 % в эффект рЛф на Ca^{2+}-отклик нейтрофилов, следовательно, ~80 % – вход внеклеточных Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны. Вход Ca^{2+} в клетки осуществляется в основном через потенциал-зависимые, рецептор-управляемые и депо-зависимые Ca^{2+}-каналы [17]. При использовании $NiCl_2$ – блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов Т-типа, регистрировалось значительно меньшее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызванное добавлением рЛф (рис. 4). Предварительное инкубирование клеток с верапамилом – антагонистом потенциал-управляемых Ca^{2+}-каналов L-типа, не влияло на рЛф-индуцированное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Ca^{2+}-ответ на стимуляцию рЛф нейтрофилов имеет вид кривой с острым подъемом и спадом в течение 1 мин, максимум $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме достигается через 2-3 с после начала стимуляции. Известно, что через каналы Т-типа в клетки поступает быстрая составляющая кальциевого тока и после открытия каналы Т-типа быстро инактивируются. Каналы L-типа, будучи активированными, сохраняют это состояние довольно долго [17]. Принимая во внимание вышесказанное, можно заключить, что рЛф, по-видимому, стимулирует открытие потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов Т-типа, которые обеспечивают увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Кроме того, необходимо отметить, что при последующем добавлении $CaCl_2$ к активированным рЛф нейтрофилам в бескальциевой среде наблюдалось повторное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ на 70±7 нМ, что является свидетельством депо-зависимого входа Ca^{2+}, ассоциированного с частичным опустошением ЭР при действии рЛф.

Известно, что при праймировании нейтрофилов активность протеинкиназ может увеличиваться в несколько раз [18]. Одним из механизмов праймирования является усиление фосфорилирования белков по остаткам тирозина. К настоящему времени хорошо охарактеризован ряд сигнальных путей, активируемых тирозинкиназами. Они включают фосфолипазу С (PLC) и фосфатидилинозитол-3-киназу, активация которых приводит к высвобождению различных сигнальных интермедиаторов, одними из которых как раз и являются Ca^{2+} [19]. В работе [20] показано, что генистеин, неспецифический ингибитор тирозинкиназ, снижал Con A-индуцированную Ca^{2+} мобилизацию в нейтрофилах на 60 %. Такие ингибиторы тирозинкиназ как гербимицин А и метил-2,5-дигидроксициннамат, ингибировали β_2-интегрин-индуцированную Ca^{2+}-сигнализацию. Для других типов рецепторов было показано, что PLC-γ является одним из субстратов для Syk – одной из тирозинкиназ Src-семейства. Поэтому далее было исследовано, вовлечены ли тирозинкиназы в Ca^{2+}-сигнал нейтрофилов в ответ на рЛф. Типичные кинетические кривые рЛф-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах в отсутствие и в присутствии генистеина представлены на рисунке 5а. Так, генистеин в исследуемом диапазоне концентраций (10-100 мкМ) ингибирует Ca^{2+}-отклик нейтрофилов на рЛф (рис. 5б), что свидетельствует в пользу вовлеченности тирозинкиназ в прайминг нейтрофилов при действии рЛф. Можно предположить, что праймирующий эффект рЛф определяется частичным фосфорилированием p47phox, подготавливая его к последующей полной активации. Таким же реакциям фосфорилирования при действии рЛф могут подвергаться и остальные цитозольные субъединицы НАДФН-оксидазного комплекса.

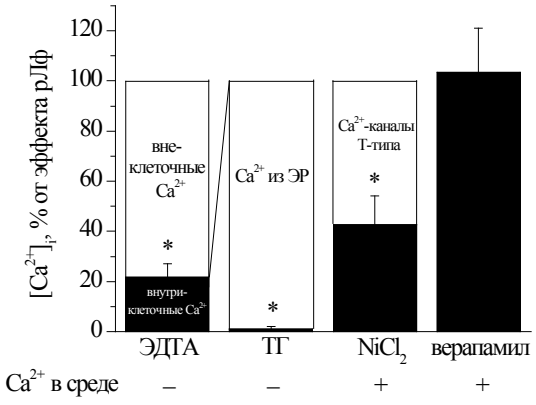


Рисунок 4. Влияние ЭДТА (1 мМ) – хелатора внеклеточных Ca^{2+}, ТГ (2 мкМ) – блокатора Ca^{2+}-АТФазы ЭР, $NiCl_2$ (1 мМ) – блокатора Ca^{2+}-каналов Т-типа и верапамила (10 мкМ) – ингибитора Ca^{2+}-каналов L-типа на рЛф-индуцированное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Эксперименты с ЭДТА и ТГ были проведены в бескальциевой среде, эксперименты с $NiCl_2$ и верапамилом – в Ca^{2+}-содержащей среде. *$p<0,05$ по сравнению с эффектом рЛф

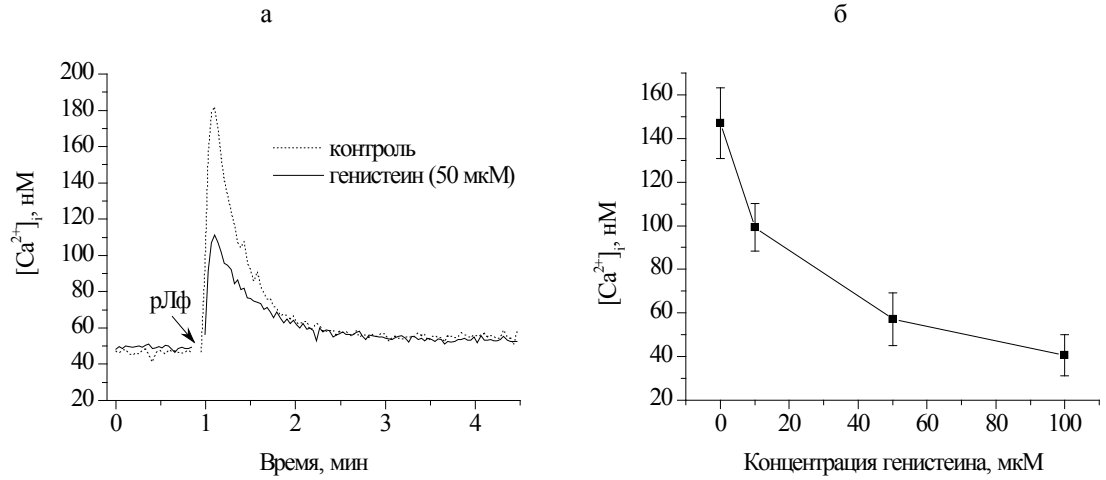


Рисунок 5. Влияние генистеина (ингибитора тирозинкиназ) на рЛф-индуцированный Ca^{2+}-отклик нейтрофилов: а – типичные кинетические кривые изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах (1×10^6 кл/мл) в отсутствие и в присутствии генистеина (50 мкМ) в Ca^{2+}-содержащей среде при действии рЛф (250 мкг/мл); б – зависимость рЛф (250 мкг/мл)-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах от концентрации генистеина

Существует классификация праймирующих агентов: быстрые агенты (фактор активации тромбоцитов, лейкотриен B4, C5a субъединица системы комплемента), которые действуют через 3-5 мин и обычно включают активацию тирозинкиназ, и длительно действующие агенты (липополисахариды, фактор некроза опухоли-α, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин 8), проявление эффекта которых регистрируется после 15-60 мин их действия [12]. Таким образом, учитывая приведенные выше данные о вовлеченности тирозинкиназ, а также тот факт, что предварительной инкубации нейтрофилов с рЛф в течение 5 мин было достаточно для праймирования респираторного взрыва нейтрофилов, можно заключить, что рЛф является быстрым праймирующим агентом.

Праймирование нейтрофилов, как правило, сопровождается изменением морфологии клетки путем перестройки актина, а именно F-актина. Актиновый цитоскелет может служить средством для координации процесса сборки НАДФН-оксидазы. Однако к настоящему времени точные механизмы влияния реорганизации цитоскелета на активацию НАДФН-оксидазы полностью не раскрыты. В работе [12] обобщены данные по ассоциации субъединиц НАДФН-оксидазного комплекса с актином или актин-связывающими белками. Так, p67phox и p40phox взаимодействуют с коронином – цитоплазматическим актин-связывающим белком, участвующим в поддержании динамичности актинового цитоскелета. Моезин, F-актин-связывающий белок, связывается с p47phox и p40phox фосфоинозитол-зависимым образом, а кофлин ассоциирован с p67phox. Для изучения вовлеченности реорганизации микрофиламентов цитоскелета в ответ нейтрофилов при действии рЛф

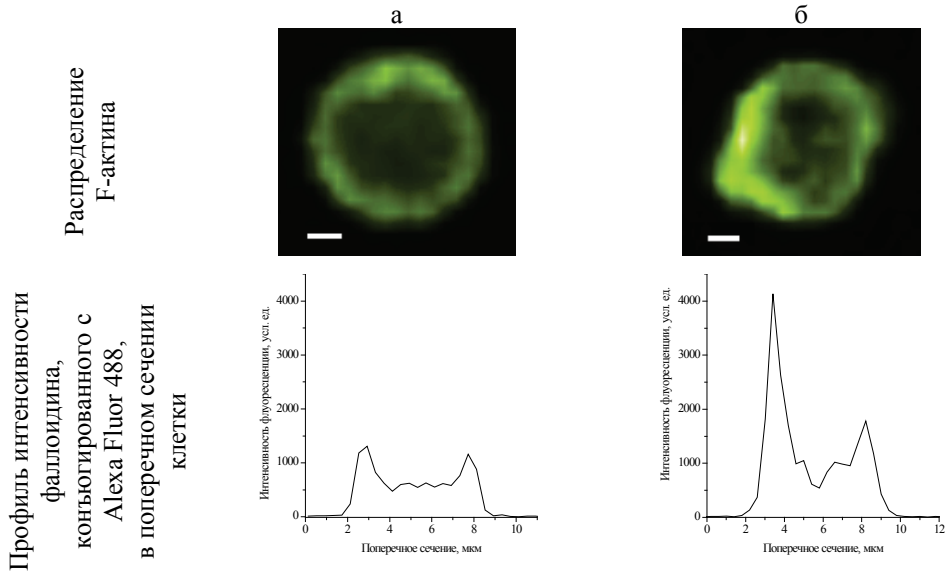


Рисунок 6. Изменения актинового цитоскелета нейтрофилов в отсутствие (а) и в присутствии (б) рЛф (250 мкг/мл), регистрируемые по флуоресценции фаллоидина, конъюгированного с Alexa Fluor 488. Профили интенсивности флуоресценции в поперечном сечении клетки приведены на нижней панели. Масштабная линейка на фотографии – 1 мкм

далее с использованием метода лазерной конфокальной микроскопии было исследовано влияние рЛф на состояние актинового цитоскелета нейтрофилов. Показано, что интактные нейтрофилы имели округлую форму с четко выраженным кортикальным цитоскелетом, который на срезе имел вид плотного кольца (рис. 6а). После инкубации нейтрофилов с рЛф (250 мкг/мл) их форма изменялась, что свидетельствует о реорганизации актинового цитоскелета (рис. 6б). Так, в присутствии рЛф выявлено перераспределение фибриллярного актина: деполимеризация кортикального актинового цитоскелета и сосредоточение F-актина у края клеточной поверхности с образованием псевдоподий различной формы у 73±8 % клеток по сравнению с 22±1 % активированных клеток в контроле. Подтверждением этих данных явилась локализация острых пиков интенсивности фаллоидина, конъюгированного с Alexa Fluor 488, на периферии клеток, проинкубированных с рЛф (рис. 6б, нижняя панель). Можно предположить, что реорганизация актинового цитоскелета нейтрофилов при действии рЛф будет приводить к изменению конформации p47phox/p40phox/p67phox комплекса.

Таким образом, рЛф, связываясь с плазматической мембраной нейтрофилов, запускает активационный сигнал, включающий в себя активацию тирозинкиназ, увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция, а также реорганизацию актинового цитоскелета клеток, приводящий к экзоцитозу содержимого специфических гранул, в том числе цитохрома b558, что, в конечном итоге, ведет к праймированию клеток и последующему усилению fMLP-индуцированного респираторного взрыва нейтрофилов.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (Б18Р-058) и РФФИ (18-515-00004).

Список литературы / References:

1. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévallo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1820, pp. 226-236.

2. Ward P.P., Paz E., Conneely O.M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol. Life Sci.,* 2005, vol. 62, pp. 2540-2548.

3. Kolaczkowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, pp. 159-175.

4. Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, vol. 62, pp. 2560-2575.

5. Oseas R., Yang H.H., Baehner R.L., Boxer L.A. Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, 1981, vol. 57, pp. 939-945.

6. Francis N., Wong S.H., Hampson P., Wang K., Young S.P., Deigner H.P., Salmon M., Scheel-Toellner D., Lord J.M. Lactoferrin inhibits neutrophil apoptosis via blockade of proximal apoptotic signaling events. *Biochem. Biophys. Acta*, 2011, vol. 1813, pp. 1822-1826.

7. Лукашевич В.С., Будевич А.И., Семак И.В., Кузнецова В.Н., Малюшкова Е.В., Пыж А.Э., Новаковская С.А., Рудниченко Ю.А., Попков Н.А., Ивашкевич О.А., Залуцкий И.В. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты. *Доклады НАН Беларуси*, 2016, т. 60, № 1, с. 72-81. [Lukashevich V.S., Budevich A.I., Semak I.V., Kuznetsova V.N., Malyushkova E.V., Pyzh A.E., Novakovskaya S.A., Rudnichenko Yu.A., Popkov N.A., Ivashkevich O.A., Zalutsky I.V. The production of recombinant human lactoferrin from milk of goat producers and its physiological effects. *Doklady NAN Belarusi*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72-81. (In Russ.)]

8. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, no. 6, pp. 3440-3450.

9. Condliffe A.M., Kitchen E., Chilvers E.R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)*, 1998, vol. 94, pp. 461-471.

10. Swain S.D., Rohn T.T., Quinn M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid. Redox Signal*, 2002, vol. 4, pp. 69-83.

11. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция. *Цитокины и воспаления*, 2007, т. 6, № 3, с. 3-13. [Mayanskiy A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Tsitokiny i vospaleniye*, 2007, vol. 6, no. 3, pp. 3-13. (In Russ.)]

12. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc. Biol.*, 2005, vol. 78, pp. 1025-1042.

13. Lacy P., Eitzen G. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front. Biosci.*, 2008, vol. 13, pp. 5559-5570.

14. Görlach A., Bertram K., Hudecova S., Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.*, 2015, vol. 6, pp. 260-271.

15. Forehand J.R., Pabst M.J., Phillips W.A., Johnston R.B. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 83, pp. 74-83.

16. Finkel T.H., Pabst M.J., Suzuki H., Guthrie L.A., Forehand J.R., Phillips W.A., Johnston R.B. Priming of neutrophils and macrophages for enhanced release of superoxide anion by the calcium ionophore ionomycin. Implications for regulation of the respiratory burst. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, pp. 12589-12596.

17. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Калинцева Я.И. *Кальциевый имиджинг в клеточных культурах и тканях.* Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2011, 28 с.

[Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Kalintseva Ya.I. *Calcium imaging in cell cultures and tissues*. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University. N.I. Lobachevsky, 2011, 28 p. (In Russ.)]

18. McLeish K.R., Knall C., Ward R.A., Gerwins P., Coxon P.Y., Klein J.B., Johnson G.L. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, vol. 64, pp. 537-545.

19. Naccache P.H. Signaling in neutrophils: a retro look. *ISRN Physiology*, 2013, vol. 2013, 13 p.

20. Asahi M., Taniguchi T., Hashimoto E., Inazu T., Maeda H., Yamamura H. Activation of protein-tyrosine kinase p72syk with concanavalin A in polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, pp. 23334-23338.

PRIMING EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN ON THE NEUTROPHIL ACTIVITY

Grigorieva D.V.[1], Terekhova M.S.[1], Shamova E.V.[1], Efremov N.A.[2], Malyushkova E.V.[1], Semak I.V.[1], Cherenkevich S.N.[1], Sokolov A.V.[3], Panasenko O.M.[4], Gorudko I.V.[1]

[1] Belarusian State University

Nezavisimosti av., 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus; e-mail: dargr@tut.by

[2] State Institution «N.N. Alexandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology»

agrogorodok Lesnoy, Minsk region, 223040, Republic of Belarus; e-mail: hakumen737@gmail.com

[3] Research Institute of Experimental Medicine

ul. Akademika Pavlova, 12, St. Petersburg, 197376, Russia; e-mail: biochemsokolov@gmail.com

[4] Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency

ul. Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; e-mail: o-panas@mail.ru

Abstract. It was established that recombinant human lactoferrin (rhLf), isolated from transgenic goats milk, binds to human neutrophils. This binding leads to an increase in intracellular Ca^{2+} due to the mobilization of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and influx of extracellular Ca^{2+} through the store-operating calcium channels and T-type calcium channels. It was found that expose of neutrophils to rhLf lead to actin cytoskeleton reorganization and increase in intracellular protein tyrosine phosphorylation. RhLf augmented fMLP-induced respiratory burst of neutrophils. Together, these finding indicate that rhLf has a modulating effect on the functional neutrophil properties. Obtained results can be used to regulate the body's immune response, aimed to enhance the functional activity of neutrophils in pathologies associated with decreased killer capacity of these cells.

Key words: *recombinant human lactoferrin, neutrophils, respiratory burst, calcium ions, tyrosine kinases, actin cytoskeleton.*

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ГАЗОТРАНСМИТТЕРОВ НА ПРОЦЕССЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ И СОКРАТИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ГЛАДКИХ МЫШЦ

Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Носарев А.В., Медведев М.А., Орлов С.Н.

ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России,

Московский тракт, 2, г. Томск, 634050, РФ; e-mail: kovalew@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Наряду с традиционными (ионы кальция, циклические нуклеотиды, продукты распада фосфоинозитидов и протеинкиназа С) механизмами регуляции сократительной функции гладкомышечных клеток (ГМК), все чаще рассматривается возможность участия в этом процессе газотрансмиттеров (NO, H_2S, CO). Взаимосвязь между уровнем их содержания в плазме крови и развитием различных заболеваний не сопровождается однотипными миотропными ответами и требует изучения механизмов влияния газомедиаторов на ГМК. Методом двойного сахарозного моста изучался вклад Na^+/H^+-обмена, $Na^+,K^+,2Cl^-$-котранспорта в механизмы влияния газотрансмиттеров на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника морской свинки, вызванную электрическим стимулом. Оказалось, что направленность сократительных реакций газотрансмиттеров на фоне безнатриевых растворов или ингибиторов Na^+/H^+-обменника и $Na^+,K^+,2Cl^-$-котранспорта изменяется (NO, CO), либо практически отсутствует (H_2S).

Ключевые слова: *сигнальные молекулы, газотрансмиттеры, эффекторные системы регуляции гладких мышц.*

Механизмы внутриклеточной трансдукции сигналов, в том числе, обусловленные газовыми посредниками, находятся и будут постоянно находиться в центре научно-исследовательского интереса из-за особого способа проникновения через мембрану [1, 2]. Начиная с оксида азота (NO), ретроградно, но все более активно уделяется внимании таким соединениям как монооксид углерода (CO) и сероводород (H_2S) [3, 4]. Если раньше последние рассматривались только с позиции своего токсического воздействия, то сейчас они активно изучаются и как регуляторы различных физиологических параметров [5]. Например, найдена зависимость между уровнем их содержания в плазме крови и развитием различных заболеваний, таких как болезнь Дауна, септический шок, спонтанная гипертензия, болезни Альцгеймера [6].

В сердечно-сосудистой системе CO и H_2S ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток (ГМК), модулируя МАРК-киназный сигнальный путь, и эффективно расслабляет гладкие мышцы кишечника, интактные и деэндотелизированные сосудистые сегменты за счет активации либо АТФ-чувствительных, Ca^{2+}-зависимых и/или потенциал-зависимых аминопиридин-чувствительных калиевых каналов [7], то далеко не ясен механизм его влияния на другие ГМК.

Соответственно, изучение механизмов влияния газотрансмиттеров на функциональную активность клеток, в том числе и гладкомышечных, может иметь значение не только с позиции дополнительных фундаментальных знаний о принципах оперирования внутриклеточных сигнальных систем, но и с позиции терапевтической и профилактической значимости. Отсутствие однозначных данных о механизмах такого регуляторного воздействия позволяют относить исследования в данной области к числу наиболее перспективных.

Целью настоящего исследования стало изучить влияние газотрансмиттеров на механизмы сопряжения возбуждения-сокращения гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили изолированные гладкомышечные сегменты мочеточника морской свинки длиной 10-12 мм. Каждое измерение электрических и сократительных свойств ГМК проводилось на одном сегменте трехкратно в течение 10-15 сек. Для изучения влияние каждого реагента на измеряемые показатели использовалось от 7 до 10 сегментов.

Для одновременной регистрации вызванных электрическим стимулом потенциалов действия (ПД) и сокращений гладкомышечных клеток использовалась методика двойного сахарозного моста. Регистрацию ПД проводили с помощью неполяризуемых электродов, сократительной активности - с использованием механоэлектрического преобразователя FT10G. Изометрический датчик силы FT10G присоединялся к 14 битному АЦП L791 («Л-КАРД», Россия), и далее сигнал отображался, записывался и обрабатывался на компьютере с использованием соответствующего программного обеспечения (L-Graph-II, «Л-КАРД», Россия).

Физиологический раствор Кребса содержал (в мМ): 120,4 NaCl, 5,9 KCl, 2,5 $CaCl_2$, 1,2 $MgCl_2$, 5.5 глюкозы, 15 $NH_2C(CH_2OH)_3$ [tris(hydroxymethyl)-aminometane] (316,4 мосМ), pH раствора – 7,35-7,40, температура 37±0,1˚C.

Используемые реактивы: тетраэтиламмония хлорид, доноры сероводорода (гидросульфид натрия) и монооксида углерода (tricarbonyldichlororuthenium(II)-dimer, CORM-2), ODQ, фенилэфрин, гистамин, форсколин, 4-аминопиридин, глибенкламид, холинхлорид, этилизопропиламилорид, буметанид (все Sigma США).

Фактические данные представлены в виде «среднее ± ошибка среднего» (X±m). В качестве контрольных (100%) принимали значения амплитуд: анэлектротонического потенциала (АЭП), ПД (пиковых компонент и длительность плато) и сокращения в растворе Кребса, либо тестирующих веществ в ответ на электрический стимул. Для проверки однородности парных или зависимых выборок был использован Т-критерий Уилкоксона (Wilcoxon mached pairs test).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Донор сероводорода NaHS в концентрации 10, 100 и 1000 мкМ активировал амплитуду сокращения и длительность потенциала действия ГМК мочеточника к 10 минуте воздействия. С увеличением концентрации донора время наступления активирующего влияния снижалось, а амплитуда эффекта нарастала. Максимум активирующего влияния на сокращение регистрировался при действии сероводорода (H_2S) в концентрации 1000 мкМ (194,7±20,4 %; n=10, p<0,05), однако при этой концентрации к 15-20 минуте действия происходило снижение активирующего влияния на амплитуду сокращения, на фоне снижения амплитуды и исчезновение осцилляций ПД. Длительность потенциала действия продолжала увеличиваться, достигая к 15 минуте 140,5±11,6 % (n=10, p<0,05) от контрольных значений. Такая картина ответной реакции на действие сероводорода может быть связана с изменением ионной проводимости мембраны ГМК мочеточника и/или с вовлечением одного или нескольких звеньев внутриклеточных регуляторных систем.

На фоне 5 мМ ТЭА NaHS в концентрациях 10 и 100 мкМ сохранял активирующее влияние на сокращения ГМК (135,6±6,2 % и 158,9±23,9 %: n=7, p<0,05), соответственно, но оно достоверно не отличалось от эффектов в отсутствии ТЭА (n=7, p<0.05). Достоверного изменения параметров ПД на фоне ТЭА при воздействии всех концентраций сероводорода не отмечалось. Активирующее действие сероводорода на ГМК в присутствии блокатора потенциал-зависимой калиевой проводимости мембраны 4-аминопиридина в концентрации 10 мкМ ослаблялось: увеличение амплитуды сокращения к 10 минуте составило 110,0±5,7 % (n=8, p<0,05), тогда как в его отсутствии 153,7±20,7 % (n=6, p<0,05). В концентрациях 100 и 1000 мкМ NaHS продолжал оказывать активирующие влияние на амплитуду сокращения ГМК мочеточника:179,7±31,3 % и 222,4±55,4 % (n=8, p<0,05), соответственно. При использовании блокатора АТФ-зависимой калиевой проводимости мембраны глибенкламида (100 мкМ) добавление сероводорода (NaHS, 10 мкМ) не приводило к статистически значимым изменениям электрической и сократительной активности ГМК. Повышение концентрации NaHS до 100 мкМ приводило к увеличению амплитуды сокращения до 138,2±17,6 % (n=9, p<0,05), что не отличалось от контрольных значений, а в концентрации NaHS 1000 мкМ вызывал противоположный эффект: амплитуда сокращения ГМК, снижалась до 82,3±14,6 % (n=9, p<0,05).

Таким образом, предобработка блокаторами калиевой проводимости мембраны предотвращала активирующие влияние только низких концентраций NaHS (10 мкМ). При более высоких концентрациях (100 и 1000 мкМ) активирующее влияние сероводорода на предобработанные ТЭА и 4-аминопиридином ГМК мочеточника хоть и сохранялось, но достоверно снижалось, и даже изменялось на противоположный на фоне глибенкламида.

Для изучения кальциевой компоненты ПД ГМК мочеточника в качестве мишени для сероводорода использовался раствор с эквимолярным замещением натрия хлорида на холинхлорид. Добавление в безнатриевый раствор 5 мМ ТЭА привело к еще большей активации сократительной активности ГМК (288,2±36,4 %; n=9, p<0,05). Донор сероводорода в концентрации 10 мкМ в этих условиях сохранял свое активирующие влияние (141,0±18,8 %; n=9, p<0,05). При более высоких концентрациях эффект сменялся на противоположный: происходило угнетение сократительной и электрической активности ГМК. При добавлении 100 и 1000 мкМ NaHS амплитуда сокращения снижалась до 53,7±6,4 % и 31,2±6,4 % (n=9, p<0,05), соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что активирующие эффекты сероводорода в малых концентрациях (10 мкМ) реализуются через изменение кальциевой проводимости мембраны ГМК мочеточника.

Дополнительное повышение концентрации внутриклеточного кальция можно производить с помощью биологически-активных веществ (БАВ), в частности фенилэфрина и гистамина.

Добавление фенилэфрина приводило к увеличению амплитуды сокращения и длительности плато потенциала действия до 150,3±6,5 % и 110,7±9,6 % (n=9, p<0,05), соответственно (рис. 1А). На фоне действия фенилэфрина NaHS на всем диапазоне концентраций сохранял активирующее влияние на амплитуду сокращения ГМК, однако этот эффект был ниже, чем в отсутствии a_1-адреномиметика. Амплитуда сокращения при действии 10 мкМ NaHS увеличивалась до 122,1±5,1 % (n=10, p<0,05), 100 мкМ – до 152,5±9,3 % (n=10, p<0,05), 1000 мкМ – 164,5±14,1 %(n=10, p<0,05), от контрольных значений действия фенилэфрина.

Добавление гистамина в раствор Кребса также вело к увеличению длительности плато ПД и амплитуды сокращений ГМК до 113±5,9 % и 164,1±14,6 % (n=10, p<0,05), соответственно (рис. 1Б). Амплитуда сокращения к 10-ой минуте воздействия 10 мкМ NaHS снижалась и составила 92,8±3,7 % (n=10, p<0.05). Увеличение концентрации донора сероводорода не приводило к статистически значимым изменениям амплитуды сокращения ГМК.

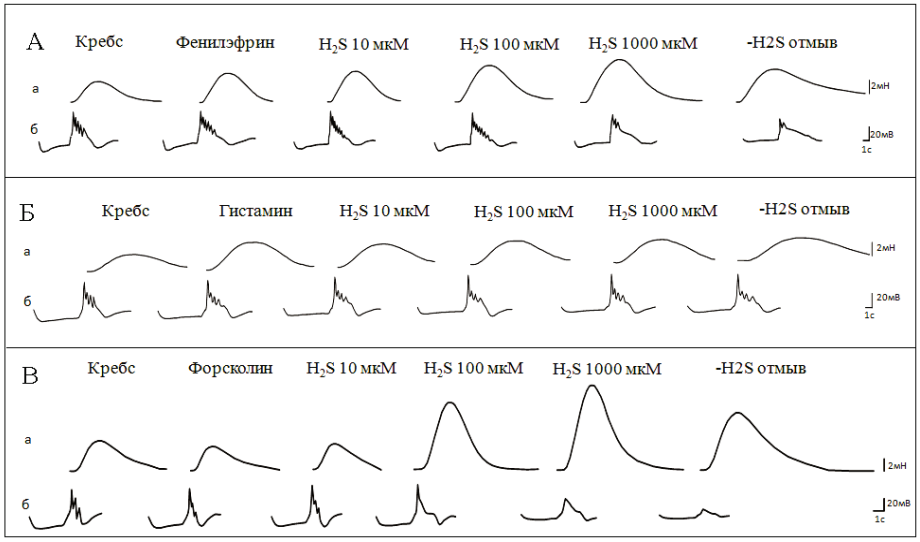


Рисунок 1. Влияние сероводорода на сократительную (а) и электрическую (б) активность ГМК мочеточника морской свинки на фоне гистамина (А), фенилэфрина (Б), форсколина (В)
Обозначения: справа – калибровочный сигнал и отметка времени

Таким образом, предобработка БАВ изменяла активирующие эффекты сероводорода. Если при действии фенилэфрина они достоверно снижались, то в присутствии гистамина практически отсутствовали.

Для изучения роли цАМФ-зависимой сигнальной системы в эффектах сероводорода использовали активатор аденилатциклазы форсколин. Его добавление в концентрации 1 мкМ приводило к ожидаемому угнетению сократительной активности до 72,2±9,9 % (n=8, p<0,05) и уменьшению длительности плато потенциала действия до 80,4±6,3 % (n=8, p<0.05), что обусловлено активацией калиевой проводимости мембраны ГМК мочеточника из-за повышения внутриклеточного уровня цАМФ (рис. 1В). Сероводород в присутствии форсколина в концентрации 10 мкМ практически не изменял сократительную и электрическую активность ГМК, но в концентрациях 100 и 1000 мкМ вызывал многократное (3-4 раза) и достоверное увеличение длительности плато ПД и амплитуды сокращения.

Удаляя ионы натрия из окружающей среды, либо ингибируя оперирование Na^+/H^+-обменника и $Na^+,K^+,2Cl^-$-котранспорта, можно убедиться в участии градиентобразующего влияния ионов натрия на эффекты сероводорода. Нами было показано, что на фоне угнетения активности селективными ингибиторами Na^+/H^+-обменника (этилизопропиламилорид) и $Na^+,K^+,2Cl^-$-котранспорта (буметанид) влияние сероводорода на параметры электрической и сократительной активности ГМК мочеточника практически отсутствовало.

Добавление донора СО – CORM-2 в диапазоне концентраций 1-100 мкМ в перфузионный раствор в течение 30 минут не изменяло исходные МН и МП гладкомышечных полосок мочеточника. Однако присутствие CORM-2 в концентрации 1 мкМ в растворе Кребса вызывало слабое снижение вызванной амплитуды сокращения. К 10-ой минуте аппликации CORM-2 сократительная активность ГМК мочеточника морской свинки достигала 98,6±5,0 % (n=6, p<0,05). При этом происходило снижение амплитуды и длительности плато ПД до 89,0±5,9 % и 96,7±2,3 % (n=6, p<0,05), соответственно, от контрольных значений. Увеличение концентрации CORM-2 до 10 мкМ приводило к дальнейшему снижению амплитуды сокращения гладкомышечных полосок до 86,5±9,7 % (n=6, p<0,05); снижение амплитуды ПД к 10-ой минуте составило 88,9±4,2 % (n=6, p<0,05), при этом длительность плато ПД уменьшилась до 91,7±6,0 % (n=6, p<0,05). При добавлении CORM-2 в концентрации 10 мкМ к 10-ой минуте наблюдали дальнейшее снижение амплитуды сокращения до 81,5±3,0 % (n=6, p<0,05), амплитуда потенциала действия составила 87,3±1,9 % (n=6, p<0,05), а длительность плато ПД уменьшилась до 90,7±3,2 % (n=6, p<0,05), по сравнении с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса.

Для изучения влияния монооксида углерода на проницаемость мембраны гладкомышечных клеток для ионов калия использовали неизбирательный блокатор калиевых каналов тетраэтиламмония хлорид (ТЭА). Само добавление 5 мМ ТЭА в раствор Кребса вызывало увеличение амплитуды сокращения ГМК до 135,7±8,1 % (n=6, p<0,05) и длительности ПД до 115,5±7,4 % (n=6, p<0,05), по сравнению с контрольными значениями в нормальном растворе Кребса. На фоне ТЭА CORM-2 в концентрации 10 мкМ вызывал снижение амплитуды сокращения до 87,0±10,8 % (n=6, p<0,05), амплитуды и длительности плато ПД до 91,7±6,4 %, 93,4±7,5 % (n=6, p<0,05), соответственно (рис. 2А).

Для исследования роли цГМФ-опосредованного сигнального пути в реализации эффектов СО использовали селективный ингибитор гуанилатциклазы 1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-l-one (ODQ). Добавление ODQ в концентрации 1 мкМ в раствор Кребса значимо не влияло на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника. После 10-минутной предобработки ODQ (1 мкМ) добавление 10 мкМ CORM-2 (рис. 2Б) вызывало снижение амплитуды сокращения гладких мышц до 90,9±4,2 % (n=6, p<0,05), амплитуда и длительность плато ПД составляли 97,2±10,3 % и 99,7±10,0 % (n=6, p<0,05), соответственно.

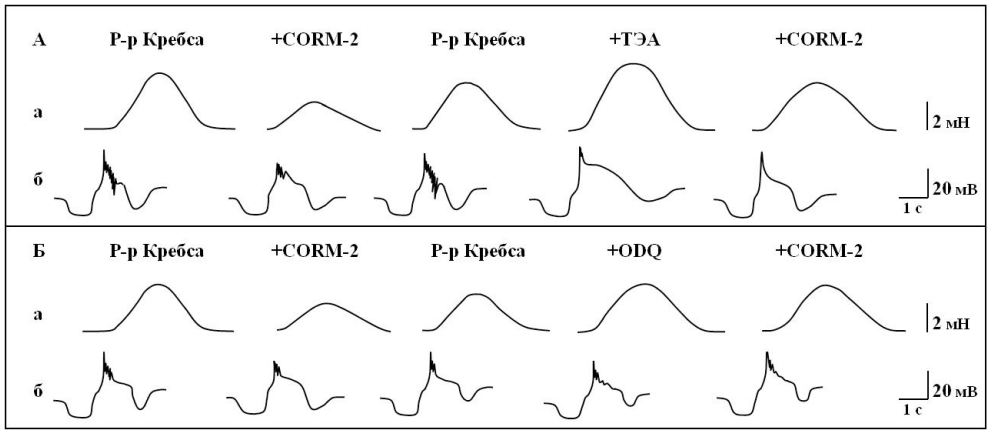


Рисунок 2. Влияние монооксида углерода на сократительную (а) и электрическую (б) активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки на фоне действия 5 мМ ТЭА (А) и 1 мкМ ODQ (Б). Остальные обозначения как на рисунке 1

Добавление 10 мкМ α_1-адреномиметика фенилэфрина в раствор Кребса приводило к увеличению амплитуды сокращения гладких мышц мочеточника до 140,7±8,1 % (n=6, p<0,05), при этом амплитуда ПД составляла 90,4±4,6 % (n=6, p<0,05), длительность плато ПД увеличивалась до 107,7±6,8 % (n=6, p<0,05) по сравнению с контрольными значениями Сходный активирующий эффект регистрировался в присутствии 10 мкМ гистамина – активатора H_1-гистаминергических рецепторов: амплитуда сокращения гладких мышц мочеточника возрастала до 125,2±10,3 % (n=6, p<0,05), амплитуда ПД и длительность плато ПД составили 111,2±2,6 % (n=6, p<0,05) и 147,4±11,2 % (n=6, p<0,05) соответственно (рис. 3). На фоне действия фенилэфрина амплитуда сокращений, потенциала действия и длительность плато ПД на 10 минуте аппликации CORM-2 (10 мкМ) составили 85,6±5,9 %, 90,0±5,7 %, 94,0±6,9 % (n=6, p<0,05) соответственно от контрольных значений. На фоне действия гистамина амплитуда сокращений, потенциала действия и длительность плато ПД на 10 минуте аппликации CORM-2 (10 мкМ) составили 86,8±6,4 %, 92,0±8,5 %, 101,7±9,2 % (n=6, p<0,05).

Таким образом, присутствие БАВ достоверно усиливало релаксирующие эффекты донора монооксида углерода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модулирование сократительных свойств гладкомышечных клеток требует детальных знаний о механизмах регуляции развития и поддержания сокращения. К сигнальным системам, выполняющим в клетке регуляторную функцию, относятся и так называемые газовые трансмиттеры, среди которых в последнее время большое внимание уделяется сероводороду [6] и монооксиду углерода [4, 8]. При исследовании влияния сероводорода на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки было установлено его активирующие действие на амплитуду сокращения и длительность потенциала действия. Как уже говорилось, такая картина ответной реакции может быть связана с вовлечением внутриклеточных регуляторных систем и/или ионной проводимости мембраны.

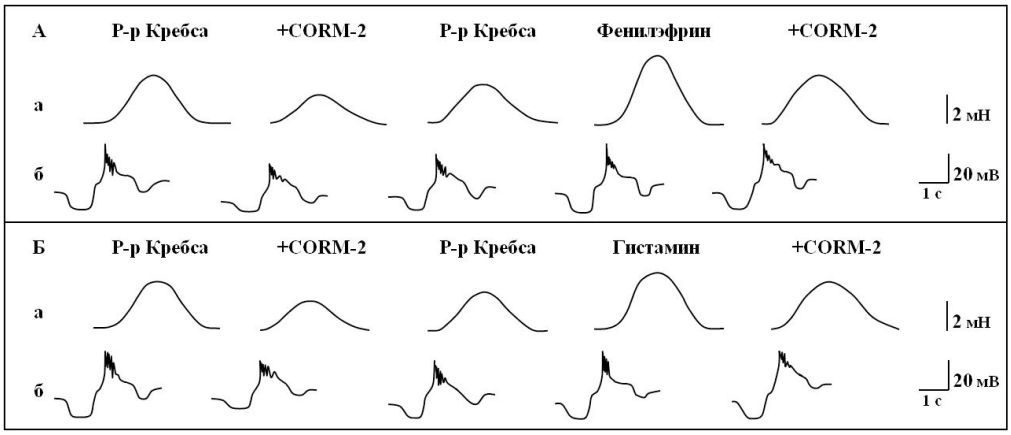


Рисунок 3. Влияние монооксида углерода на сократительную (а) и электрическую (б) ГМК мочеточника морской свинки в присутствии биологически активных веществ: фенилэфрина (А) и гистамина (Б). Остальные обозначения как на рисунке 1

В наших экспериментах с донатором сероводорода было показано, что характер его влияния на электрическую и сократительную активность ГМК мочеточника сходен с действием блокаторов калиевых каналов: ТЭА, 4-аминопиридина и глибенкламида. Хотя в литературе обсуждаются данные о вовлечении потенциал-зависимого и АТФ-чувствительного компонентов калиевой проводимости мембраны в этот эффект [9], оказалось, что активирующие влияние сероводорода на сократительные свойства ГМК мочеточника морской свинки в большей мере подавляется при блокировании АТФ-зависимых каналов глибенкламидом.

Если калиевая проводимость мембраны является основной эффекторной системой сигнальных путей, связанных с повышением уровня цАМФ, то форсколин – известный активатор аденилатциклазы, исходно снижая электрическую и сократительную активность ГМК, дополнительно «выпячивает» мишень, «поражение» которой сероводородом и приводило к достоверному и многократному увеличению амплитуды сокращения и длительности плато ПД ГМК мочеточника.

Анализ влияния сероводорода на натриевую и/или кальциевую проводимость мембраны ГМК мочеточника с помощью модифицированных безнатриевых и ТЭА-содержащих растворов Кребса еще раз подтверждает точку зрения о том, что в эффектах сероводорода основную роль играет калиевая проводимость мембраны, но ее вклад в этот процесс реализуется при больших концентрациях (100 и 1000 мкМ) донора NaHS. По-видимому, влияние малых концентраций NaHS (10 мкМ) на амплитуду сокращения ГМК мочеточника осуществляется и через активацию кальциевой компоненты ПД.

Предобработка БАВ (фенилэфрин и гистамин) изменяла активирующие эффекты сероводорода. Известно, что отличие влияния фенилэфрина и гистамина на ионную проводимость мембраны ГМК мочеточника обусловлены различной степенью воздействия на калиевую (фенилэфрин) и натриевую (гистамин) компоненту ПД. Не исключено, что показанные отличия могут быть связаны с влиянием сероводорода на измененные характеристики ионной проницаемости при действии БАВ.

Наши данные подтверждают участие и натриевой проводимости мембраны ГМК мочеточника в эффектах сероводорода. При угнетении процессов, сопряженных с натриевой проводимостью мембраны ГМК (безнатриевые растворы и ингибиторы Na^+/H^+-обменника и $Na^+,K^+,2Cl^-$-котранспорта), активирующие эффекты сероводорода ослаблялись, либо исчезали. Возможно, что активирующие действие сероводорода на амплитуду сокращения и длительность ПД мочеточника обусловлено не только угнетающим влиянием на калиевую проводимость мембраны, но и непосредственно с Na- опосредованным подавлением активирующего эту проводимость фермента, например, аденилатциклазы.

Дозозависимое влияние CO на электрическую и сократительную активность гладкомышечных клеток мочеточника морской свинки связано с изменением ионной проводимости мембраны гладких мышц и/или с вовлечением одного или нескольких звеньев сети внутриклеточных регуляторных систем. В присутствии фенилэфрина и гистамина сохранялся угнетающий эффект CORM-2 на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника морской свинки.

В экспериментах с использованием с ТЭА донор CO вызывал снижение амплитуды сокращения, амплитуды и длительности плато ПД. При этом угнетающий эффект его был достоверно ниже, чем при аппликации CORM-2 без добавления блокатора калиевой проводимости мембраны. Эти данные еще раз подтверждают точку зрения о том, что в гладких мышцах изменения калиевой проводимости, в отличие от других электровозбудимых структур, играют доминирующую роль в реализации различных регуляторных воздействий.

Анализ влияния CO на электрические и сократительные свойства ГМК мочеточника морской свинки с использованием селективного ингибитора растворимой гуанилатциклазы ODQ показал, что важным компонентом угнетающего эффекта CORM-2 является его активирующее влияние на гуанилатциклазу. Возможно, активация ГЦ ведет к увеличению образования цГМФ, являющегося одним из важных посредников внутриклеточной передачи информации. Одним из основных эффекторных механизмов действия цГМФ (ПК G) является повышение именно калиевой проводимости мембраны гладкомышечных клеток.

Список литературы / References:

1. Szabo C. Hydrogen sulfide and its therapeutic potential. *Nature Reviews*, 2007, vol. 6, pp. 917-935.

2. Leffler Ch.W., Parfenova H., Jaggar J. H. Carbon monoxide as an endogenous vascular modulator. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. 1-11.

3. Wagner C.A. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecula and blood pressure regulator. *Journal of Nephrology*, 2009, vol. 22 (2), pp. 173-176.

4. Heinemann S.H., Hoshi T., Westerhausen M., Schiller A. Carbon monoxide – physiology, detection and controlled release. *Chem. Commun.*, 2014, vol. 50, pp. 3644-3660.

5. Гусакова С.В., Ковалев И.В., Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Петрова И.В., Носарев А.В., Алейник А.Н., Орлов С.Н. Влияние моноксида углерода и сероводорода на трансмембранный ионный транспорт. *Биофизика*, 2017, т. 62, вып. 2, с. 290-297. [Gusakova S.V., Kovalev I.V., Birulina Yu.G., Smagliy L.V., Petrova I.V., Nosarev A.V., Aleinyk A.N., Orlov S.N. The Effects of Carbon Monoxide and Hydrogen Sulfide on Transmembrane Ion Transport. *Biofizika,* 2017, vol. 62, no. 2, pp. 290-297. (In Russ.)]

6. Polhemus D.J., Lefer D.J. Emergence of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Gaseous Signaling Molecule in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.,* 2014, vol. 114, pp. 730-737.

7. Ковалев И.В., Гусакова С.В., Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Медведев М.А., Орлов С.Н., Кубышкин А.В., Носарев А.В. Роль газовых посредников в регуляции функций гладких мышц: вероятные эффекторные системы.

Бюллетень сибирской медицины, 2014, т. 13, № 6, с. 139-145. [Kovalev I.V., Gusakova S.V., Birulina Yu.G., Smagly L.V., Medvedev M.A., Orlov S.N., Kubishkin A.V., Nosarev A.V. The role of gasotransmitters in regulating of the functions of smooth muscles: the possible effector systems. *Byulleten' sibirskoj mediciny*, 2014, vol. 13, no. 6, pp. 139-145. (In Russ.)]

8. Wilkinson W.J., Kemp P.G. Carbon monoxide: an emerging regulator of ion channels. *J. Physiol.*, 2011, vol. 589, no. 13, pp. 3055-3062.

9. Tang G. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, 2005, vol. 68, pp. 1757-1764.

MECHANISMS OF THE ACTION OF GASOTRANSMITTERS ON THE PROCESSES OF REGULATION OF THE ELECTRICAL AND CONTRACTILE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLES

Kovalev I.V., Birulina Yu.G., Gusakova S.V., Smagliy L.V., Petrova I.V., Nosarev A.V., Medvedev M.A., Orlov S.N.

Siberian State Medical University

Moscovskiy trakt, 2, Tomsk, 634050, Russia; e-mail: kovalew@mail.ru

Abstract. Along with the traditional mechanisms (calcium ions, cyclic nucleotides, decay products of phosphoinositides and protein kinase C), the mechanisms of regulation of the contractile function of smooth muscle cells (SMC) are increasingly being considered for the possibility of participation in this process of gasotransmitters (NO, H2S, CO). The relationship between the level of their content in the blood plasma and the development of various diseases is not accompanied by the same type of miotropic responses and requires studying the mechanisms of the influence of gasomediators on the SMC. The contribution of Na^+/H^+-exchange, $Na^+,K^+,2Cl^-$-cotransport to the mechanisms of the effect of gasotransmitters on the electrical and contractile activity of the SMC of the guinea pig ureter caused by an electrical stimulus was studied using the double sucrose bridge method. It turned out that the orientation of the contractile reactions of gasotransmitters against the background of non-sodium solutions or inhibitors of the Na^+/H^+-exchanger and Na^+, K^+, $2Cl^-$-cotransport varies (NO, CO) or practically disappear (H_2S).

***Key words*:** *signaling molecules, gasotransmitters, effector systems of smooth muscles.*

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ

Луценко В.Е.[1], Григорьева Д.В.[1], Черенкевич С.Н.[1], Панасенко О.М.[2, 3], Соколов А.В.[2, 4, 5], Горудко И.В.[1]

[1] Белорусский государственный университет
просп. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Республика Беларусь; e-mail: nika.lutsenko@tut.by
[2] ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России
г. Москва, РФ
[3] ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России,
г. Москва, РФ
[4] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
г. Санкт-Петербург, РФ
[5] Санкт-Петербургский государственный университет
г. Санкт-Петербург, РФ
Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Показана принципиальная возможность оценки функциональной активности нейтрофилов флуоресцентным методом с использованием целестинового синего В и галлоцианина. Установлено, что в клеточных суспензиях окисление галлоцианина связано с продукцией супероксидного анион-радикала, а целестинового синего В – с продукцией активных форм галогенов. С использованием красителей галлоцианина и целестинового синего В показана возможность избирательной регистрации активных форма кислорода и галогенов флуоресцентным методом при активации нейтрофилов широким спектром агонистов различной природы. Сделан вывод о том, что указанные красители могут быть использованы при разработке методов идентификации активных форм кислорода и галогенов в клеточных суспензиях, оценки функционального состояния нейтрофилов, разработке терапевтических методов лечения с помощью антиоксидантов при заболеваниях, ассоциированных с развитием окислительного/галогенирующего стресса.
***Ключевые слова**: нейтрофилы, окислительный стресс, активные формы кислорода, активные формы галогенов, галлоцианин, целестиновый синий В, флуоресценция.*

Активные формы кислорода (АФК) и галогенов (АФГ) играют решающую роль в физиологических процессах, таких как биосинтез, межклеточная сигнализация, апоптоз, уничтожение патогенов и др. Однако они также способствуют развитию широкого спектра патологий, прогрессирование многих из которых ведет к смерти. Среди них сердечно-сосудистые, онкологические, неврологические и другие заболевания [1]. Существует несколько источников АФК, одним из которых является НАДФН-оксидаза нейтрофилов – самой многочисленной группы циркулирующих лейкоцитов у взрослого человека (60 %) [2]. Первичный продукт активности НАДФН-оксидазы – супероксидный анион-радикал ($^{\bullet}O_2^-$), является предшественником широкого спектра активных форм кислорода, азота и галогенов [3]. Преобразование АФК в АФГ, в частности в хлорноватистую (HOCl), бромноватистую (HOBr) и иодноватистую (HOI) кислоты, катализируется миелопероксидазой (МПО), которая в больших количествах (2-5 % от сухого веса клеток) содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов [4]. Увеличение активности/концентрации МПО и продуктов взаимодействия биомолекул с HOCl выявлено при различных заболеваниях: атеросклероз, ревматоидный артрит, острая почечная недостаточность, муковисцидоз и др. [4, 5].

Чувствительные методы обнаружения АФГ и продуктов их реакций с биологическими молекулами необходимы как для лучшего понимания механизмов межмолекулярных взаимодействий, протекающих в организме, так и для разработки стратегий терапевтического вмешательства с использованием антиоксидантов, регистрации и контроля активности НАДФН-оксидазы и МПО. Среди методов, направленных на обнаружение АФК и АФГ, можно выделить иммуноферментный анализ, масс-спектрометрию, методы электронного парамагнитного (в том числе метод спиновых ловушек) и ядерного магнитного резонанса, проточной цитофлуориметрии, конфокальной микроскопии, электрохимический метод и др. [6, 7]. В большинстве своем эти методы являются дорогостоящими и/или малодоступными. Флуоресцентный анализ, отличающийся высокой чувствительностью и доступностью, также широко применим для обнаружения АФК и АФГ.

В качестве субстратов для качественной и количественной оценки образования АФК и АФГ *in vitro* используют такие вещества как монохлордимедон, тирозин, 5-тио-2-нитробензойную кислоту, тетраметилбензидин, ненасыщенные фосфатидилхолины, таурин, дигидродамин, аминофенилфлуоресцеин и другие [6, 8-10]. Следует отметить, что лишь некоторые из перечисленных субстратов обладают избирательностью в отношении АФК или АФГ, многие из них не позволяют осуществлять непрерывную регистрацию образования соответствующих продуктов, обладают ограниченной стабильностью на свету,

являются коммерчески недоступными или же требуют создания специальных стандартизированных условий наблюдения, что стимулирует поиск новых веществ, пригодных для чувствительного обнаружения АФК и АФГ.

Ранее [11, 12] было показано, что краситель целестиновый синий В (СВ) является перспективным агентом для регистрации продукции АФГ и их производных нейтрофилами. Тем не менее, помимо несомненных преимуществ, данный краситель обладает и рядом недостатков. Так, СВ не растворим в воде и фосфатно-солевом буфере, нестабилен на свету, необходимо присутствие таурина в буферном растворе, кроме того, кинетические кривые окисления СВ в клеточных суспензиях при активации рядом стимуляторов имеют достаточно длительный лаг-период, что затрудняет идентификацию продукции АФГ нейтрофилами. В связи с этим перспективной является разработка альтернативного метода идентификации АФГ нейтрофилами. Среди исследуемых ранее красителей [11] интерес представляет галлоцианин (GC). Он является структурным аналогом СВ, однако отличается хорошей растворимостью в фосфатно-солевом буфере и большей фотостабильностью.

Цель данной работы – исследовать возможность использования галлоцианина для регистрации продукции АФК и АФГ нейтрофилами, а также произвести сравнительный анализ возможности применения красителей галлоцианина и целестинового синего В для оценки функционального состояния нейтрофилов крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стимуляторов нейтрофилов были выбраны: форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA), N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), а также растительные лектины различной углеводной специфичности: WGA (*Triticum vulgaris* агглютинин) – GlcNAc-специфичный лектин зародышей пшеницы, CABA (*Caragana arborescens* агглютинин) – лектин караганы древовидной, специфичный к остаткам GalNAc, Con A (*Canavalia ensiformis* агглютинин) – маннозосвязывающий лектин семян канавалии мечевидной, галактозо-специфичный лектин сои SBA (*Glycine hispida* агглютинин), а также GalNAc/галактозо-специфичный лектин семян фасоли обыкновенной PHA-L (*Phaseolus vulgaris* агглютинин).

Нейтрофилы выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности гистопака. Венозную кровь здоровых доноров, стабилизированную 109 мМ цитратом натрия (1:9, v/v), смешивали с 6 %-ным раствором декстрана Т70 (5:1, v/v), что приводило к осаждению эритроцитов в течение 40 мин при комнатной температуре. При помощи пластиковых шприцов собирали слой обогащенной лейкоцитами плазмы в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Далее примесь эритроцитов удаляли гипотоническим лизисом, добавляя к осадку клеток сначала 3 мл охлажденного 0,2 %-ного NaCl, а затем восстанавливали изотоничность путем добавления 3 мл 1,6 %-ного NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Если смесь клеток содержала эритроциты, гипотонический лизис проводили повторно. Осадок клеток ресуспензировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 10 мМ Na_2HPO_4/KH_2PO_4, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (pH 7,35), наслаивали по 5–6 мл полученной суспензии на 3 мл гистопака-1077 и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g при комнатной температуре. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ, содержащем 2 мг/мл D-глюкозы и хранили при 4 °C в течение нескольких часов. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97–98 %, число жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим – не менее 96 %.

Продукцию H_2O_2 нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре СМ 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием скополетина. Скополетин является флуоресцентным субстратом пероксидазы хрена, при окислении которого в присутствии H_2O_2 образуется нефлуоресцирующий продукт. К 1 мл суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл в ФСБ с 1 мМ $CaCl_2$, 0,5 мМ $MgCl_2$, 37 °C), содержащей 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы хрена и 1 мМ NaN_3, добавляли активатор. Как правило, для стандартизации условий эксперимента предварительно готовили «коктейль» реакционной смеси путем смешивания водных растворов 0,2 мМ скополетина, 2 мг/мл пероксидазы хрена и 0,1 М NaN_3 в соотношении 1:2:2 (v/v/v). Кинетику окисления скополетина регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения – 350 нм, регистрации – 460 нм).

Продукцию АФК и АФГ нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом с использованием красителей (GC и СВ). К нейтрофилам (10^6 кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ $CaCl_2$ и 0,5 мМ $MgCl_2$ (в случае СВ раствор содержал также 20 мМ таурина), добавляли СВ/GC (20/5 мкМ), а также исследуемый активатор и сопутствующие вещества при необходимости. Оба красителя не обладают собственной флуоресценцией, увеличение интенсивности которой по сравнению с фоновым уровнем происходит при их окислении. Длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции для GC – 360 нм и 490 нм соответственно, для СВ – 460 нм и 590 нм. Регистрацию проводили при 37 °C и постоянном перемешивании. В качестве параметра, характеризующего продукцию АФК и АФГ нейтрофилами, была выбрана степень окисления (h) – изменение интенсивности флуоресценции, вызванное окислением красителей, по сравнению с фоновым уровнем через 7 минут после начала активации.

Статистическая обработка данных.

Статистическую и графическую обработку полученных данных выполняли в пакете программ OriginPro 2016. Сглаживание сигналов флуоресценции проводили с использованием локально-линейной модели “Lowess”. Данные на рисунках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистические различия считали достоверными при статистической значимости $p<0,05$, рассчитанной по критерию Стьюдента.

Типичные кинетические кривые представляют собой инвариант 3-5 независимых экспериментов с образцами разных доноров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в серии бесклеточных экспериментов нами было показано, что GC окислялся HOCl, но не H_2O_2. При исследовании флуоресцентных характеристик окисленного GC было выявлено, что для проведения экспериментов оптимальными длинами волн возбуждения и регистрации флуоресценции являются 360 нм и 490 нм соответственно [13].

Следующим шагом в исследовании возможности использования GC в качестве флуоресцентного зонда для регистрации продукции АФГ стали бесклеточные эксперименты в системе «МПО-H_2O_2-Cl^-». Как видно из данных, представленных на рисунке 1, добавление H_2O_2 (50 мкМ) к раствору, содержащему МПО (2 нМ) и GC (5 мкМ), приводило к увеличению интенсивности флуоресценции, свидетельствующему об образовании окисленного продукта. В присутствии ингибитора ферментативной активности МПО – гидразида 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН) (100 мкМ) [14], окисление GC не регистрировалось. Также необходимо отметить, что присутствие в среде таурина (5 мМ) – скавенджера HOCl, приводило к ингибированию окисления GC, что также является дополнительным свидетельством того, что GC, в отличие от своего структурного аналога CB, не окисляется производными HOCl, а именно хлораминами таурина.

Далее нами было проведено исследование изменений флуоресцентных характеристик GC в суспензии нейтрофилов, активированных агонистами различной природы. В качестве стандартных активаторов нейтрофилов, как правило, используют зимозан, латекс, сульфат бария, PMA, fMLP и др. [15]. Нами были выбраны хемотаксический пептид fMLP и форболовый эфир PMA. Действуя по рецептор-зависимому механизму (связываясь с рецепторами, ассоциированными с G-белками), fMLP инициирует сборку и активацию НАДФН-оксидазы, но не вызывает экзоцитоз МПО из азурофильных гранул нейтрофилов и, следовательно, не инициирует продукцию АФГ. Для реализации указанных процессов при действии на клетки fMLP, необходима предварительная инкубация нейтрофилов с цитохалазином B (cyt B), препятствующим полимеризации фибриллярного актина кортикального цитоскелета [16]. PMA, являясь липофильным соединением, легко проникает в клетки и, ввиду схожести молекулярной структуры с диацилглицеролом, активирует протеинкиназу C, вызывает респираторный взрыв [17] и дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов [18].

На рисунке 2*а* представлены типичные кинетические кривые окисления GC в суспензии активированных нейтрофилов. На данном рисунке можно видеть ожидаемое, исходя из описанных выше литературных данных, окисление GC в суспензии клеток при действии PMA и в системе cyth B + fMLP. Также наблюдалось окисление GC в суспензии fMLP-активированных нейтрофилов, что свидетельствует о том, что этот зонд вероятнее всего окисляется $^{\bullet}O_2^-$ – предшественником H_2O_2 (одного из субстратов МПО). Косвенным подтверждением данного предположения является тот факт, что, как было показано нами ранее [12], окисление аналога GC – CB в суспензии активированных fMLP нейтрофилов не происходит.

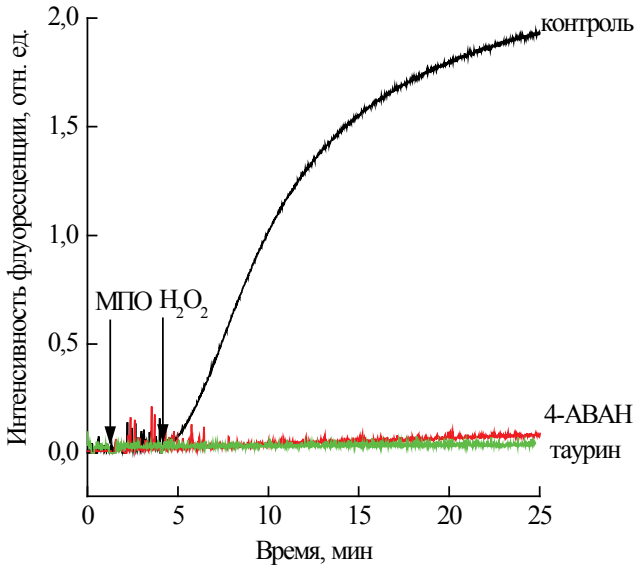


Рисунок 1. Типичные кинетические кривые окисления GC в системе «МПО-H_2O_2-Cl^-» в отсутствие и присутствии 4-АВАН (100 мкМ) или таурина (5 мМ)

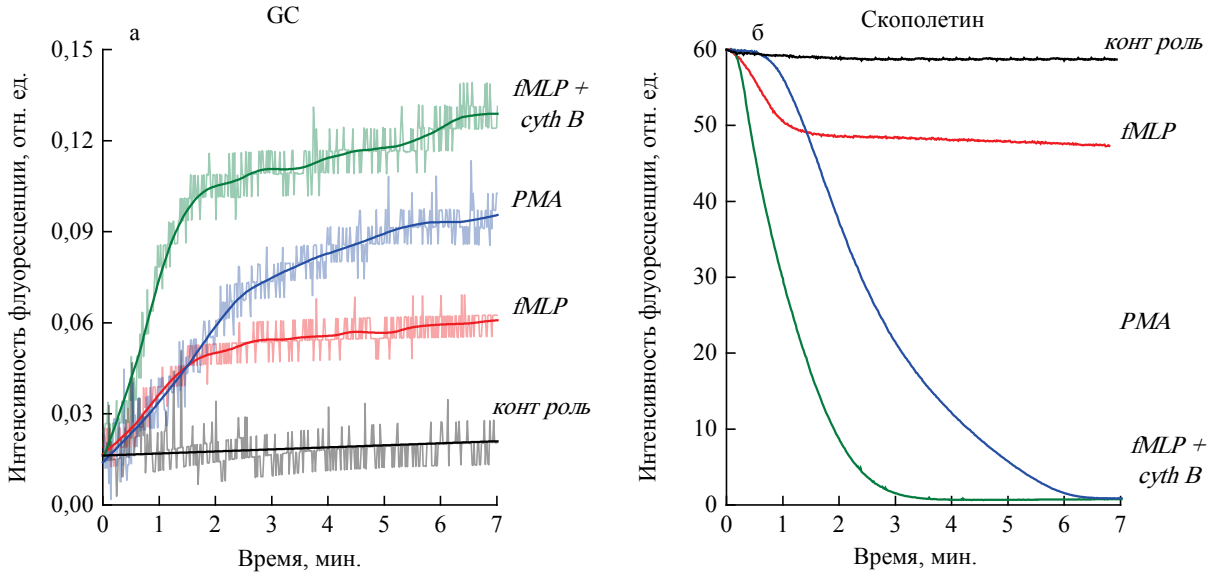


Рисунок 2. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции GC (*а*) и скополетина (*б*) в суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл) в отсутствие агонистов (*контроль*) и активированных fMLP (500 нМ) в отсутствие и в присутствии cyth B (2,5 мкг/мл) или PMA (50 нМ)

Одной из широко используемых методик регистрации респираторного взрыва нейтрофилов является так называемый скополетиновый тест, в основе которого лежит использование системы «H_2O_2 – пероксидаза хрена – скополетин». Так, при респираторном взрыве нейтрофилов, образуется $^{\bullet}O_2^-$, дисмутирующий до H_2O_2, используя который пероксидаза хрена окисляет скополетин до нефлуоресцирующего продукта. Присутствующий в суспензии NaN_3 ингибирует каталазу, а также МПО при физиологических значениях pH [19]. При проведении сравнительного анализа продукции АФК нейтрофилами при стимуляции клеток PMA и fMLP с использованием скополетинового теста и GC были выявлены схожие зависимости. Из рисунка 2*б* видно, что PMA и fMLP вызывают продукцию H_2O_2 нейтрофилами, регистрируемую по падению интенсивности флуоресценции скополетина вследствие его окисления. Также видно, что cyth B усиливает активацию НАДФН-оксидазы, что соответствует литературным данным [3, 20]. Таким образом, можно предположить, что усиление fMLP-индуцированного окисления GC в суспензии нейтрофилов, предварительно инкубированных с cyth B, также является следствием прайминга НАДФН-оксидазы и усиления продукции $^{\bullet}O_2^-$ клетками. Исходя из представленных данных следует, что окисление GC в суспензии активированных нейтрофилов обусловлено, по всей вероятности, действием АФК, генерируемых НАДФН-оксидазой, а не АФГ, образующихся в реакциях, катализируемых МПО. Предполагается, что $^{\bullet}O_2^-$ окисляет GC, не успев дисмутировать до H_2O_2 – субстрата МПО в условиях экзоцитоза фермента.

В пользу данного предположения свидетельствует и проведенный нами ингибиторный анализ. Так, ингибитор МПО – 4-АВАН (100 мкМ), не влиял на окисление GC при активации нейтрофилов fMLP (500 нМ) в присутствии cyth B (2,5 мкг/мл). Стоит отметить, что в предыдущих исследованиях [21, 22] нами было показано, что 4-АВАН (100 мкМ) достоверно снижал степень окисления CB в суспензиях fMLP-активированных нейтрофилов, предварительно инкубированных с cyth B (2,5 мкг/мл), непосредственно указывая на то, что CB окисляется соединениями, образующимися в реакциях с участием МПО. Стоит отметить, что ни маннитол – перехватчик $OH^{\bullet}$, ни таурин – перехватчик HOCl, не оказывали влияния на параметры окисления GC в суспензии fMLP-активированных нейтрофилов. В то же время супероксиддисмутаза (50 мкг/мл), катализирующая дисмутацию $^{\bullet}O_2^-$ до H_2O_2, достоверно уменьшала степень (14±4 % от контроля) окисления GC при активации нейтрофилов fMLP. Из полученных данных следует, что окисление GC в суспензии нейтрофилов происходит за счет образования $^{\bullet}O_2^-$, а возможное образование АФГ и их производных не вносит существенного вклада в данных процесс.

Таким образом, исходя из описанных выше данных, а также наших предыдущих исследований [12] можно заключить, что комплексный подход к оценке функциональной активности нейтрофилов с применением флуоресцентных красителей GC и CB дает возможность избирательно регистрировать как продукцию АФК клетками (с использованием GC), так и продукцию АФГ и их производных (с помощью CB). Данный подход был применен нами при изучении влияния растительных лектинов на функциональные ответы нейтрофилов крови человека. Ранее [23-25] было показано, что наряду с известными агонистами (fMLP, PMA, цитокины) многие растительные лектины – белки, способные к обратимому и избирательному связыванию углеводов и различных природных углеводных компонент гликоконъюгатов – оказывают стимулирующее действие на нейтрофилы, индуцируя генерацию АФК, а также способствуя экзоцитозу содержимого гранул нейтрофилов. Присутствие лектинов также идентифицировано в тканях, биологических жидкостях и на поверхности клеток человека и

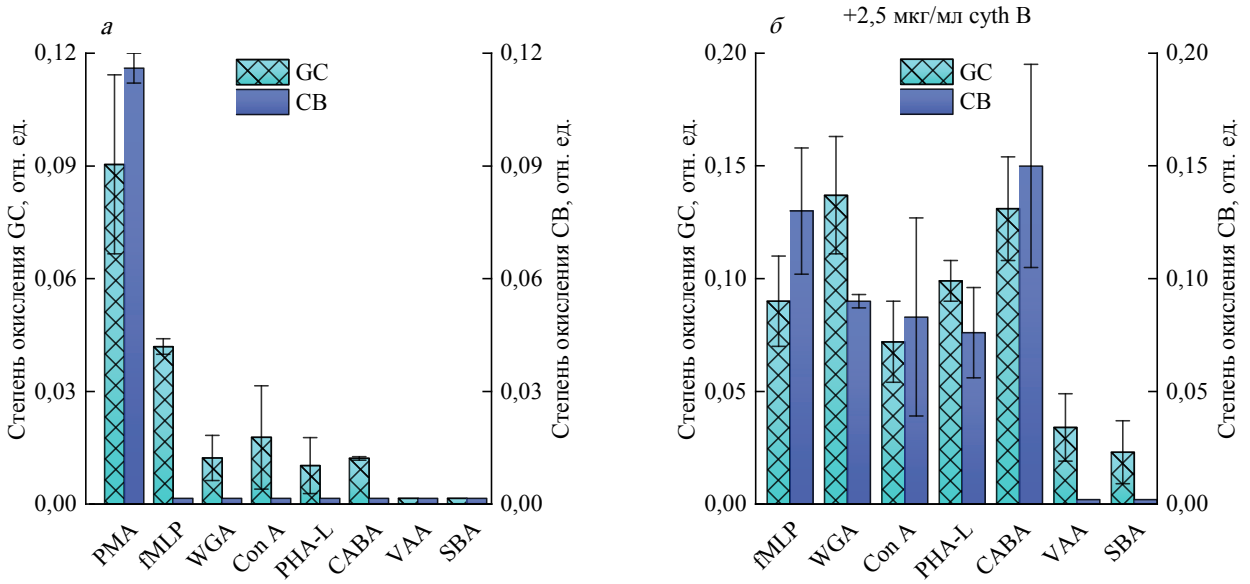


Рисунок 3. Влияние PMA, fMLP, а также растительных лектинов на степень окисления GC и CB в отсутствие (*а*) и в присутствии (*б*) cyth B (2,5 мкг/мл) в суспензиях нейтрофилов

животных. Роль этих белков в организме связана с регуляцией процессов иммунной системы и рецепции, запускающих эффекторные функции клеток [26].

В данной части работы мы исследовали влияние лектинов: WGA, Con A, PHA-L, CABA, VAA и SBA, а также уже ранее упомянутых стимуляторов (PMA и fMLP) на продукцию АФК и АФГ нейтрофилами. На рисунке 3 приведены данные по влиянию агонистов нейтрофилов на степень окисления CB и GC.

Как уже отмечалось выше, окисление CB в суспензиях нейтрофилов происходит вследствие продукции АФГ нейтрофилами, что и проиллюстрировано на рисунке 3*а* (окисление CB в суспензии нейтрофилов, активированных fMLP, в отсутствие cyth B не происходит). Как видно из рисунка 3*б*, лектины WGA, CABA, Con A и PHA-L (100 мкг/мл) вызывали респираторный взрыв и экзоцитоз МПО из нейтрофилов в присутствии cyth B (2,5 мкг/мл), о чем свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции окисленного CB, в то время как VAA и SBA (50 и 100 мкг/мл соответственно) были неактивны в этом отношении. Необходимо отметить, что используемые лектины вызывали продукцию АФГ нейтрофилами лишь в присутствии cyth B, что согласуется с данными литературы о том, что блокировка микрофиламентной системы клеток способствует высвобождению содержимого азурофильных гранул при активации лектинами [25]. WGA, CABA, Con A и PHA-L инициировали респираторный взрыв нейтрофилов и в отсутствие cyth B (рисунок 3 *а*, данные с GC), в присутствии cyth B данный эффект усиливался за счет праймирования НАДФН-оксидазы. Кроме того, из рисунка 3 видно, что VAA и SBA способны инициировать сборку и активацию НАФДН-оксидазы клеток при их предварительной инкубации с cyth B.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что использование красителей галлоцианина и целестинового синего B является перспективным для оценки функционального состоянии нейтрофилов, избирательной регистрации продукции активных форм кислорода и галогенов нейтрофилами.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (Б18Р-058) и РФФИ (18-515-00004).

Список литературы / References:

1. Brieger K., Schiavone S., Miller Jr F.J., Krause K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 2012, vol. 142, p. w13659.

2. Зак К.П. Роль нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе сахарного диабета 1-го типа у человека (аналитический обзор с включением собственных данных). *Международный эндокринологический журнал*, 2016, № 2 (74), с. 130-139. [Zak K.P. The role of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in humans (an analytical review with the inclusion of own data). *Mezhdunarodnyi endokrinologicheskiy zhurnal*, 2016, no. 2 (74), pp. 130-139. (In Russ.)]

3. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. *Цитология*, 2009, т. 51, № 6, с. 467-474. [Maltseva V. N., Safronova V. G. Ambiguity of the role of neutrophil in tumor genesis. *Tsitologiya*, 2009, vol. 51, no. 6, pp. 467-474. (In Russ.)]

4. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. *Успехи биол. химии*, 2013, т. 53, с. 195-244. [Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Uspehi biologicheskoy himii*, 2013, vol. 53, pp. 195-244. (In Russ.)]

5. Lau D., Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology. Therapeutics*, 2006, vol. 111, no. 1, pp. 16-26.

6. Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi J.R., Panizzi P. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of leukocyte biology*, 2016, vol. 99, no. 4, pp. 541-548.

7. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation research*, 2001, vol. 89, no. 3, pp. 224-236.

8. Flemmig J., Remmler J., Zschaler J., Arnhold J. Detection of the halogenating activity of heme peroxidases in leukocytes by aminophenyl fluorescein. *Free radical research*, 2015, vol. 49, no. 6, pp. 768-776.

9. Dypbukt J.M., Bishop C., Brooks W. M., Thong B., Eriksson H., Kettle A.J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, vol. 39, no. 11, pp. 1468-1477.

10. Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils: evidence for hypochlorous acid generation. *Journal of Clinical Investigation*, 1982, vol. 70, no. 3, pp. 598-607.

11. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radical Research*, 2015, vol. 49, no. 6, pp. 777-789.

12. Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Козлов О.С., Горудко И.В., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М., Соколов А.В. Флуоресцентый метод регистрации хлорноватистой кислоты и ее производных в суспензии активированных нейтрофилов с помощью целестинового синего В. *Матер. XII междунар. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2017»*, Севастополь, 2017, с. 264-268. [Lutsenko V.E., Grigoryeva D.V., Kozlov S.O., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Sokolov A.V., Fluorescent method for recording hypochlorous acid and its derivatives in a suspension of activated neutrophils via celestine blue B. *Proceedings of XII International Science-Technical Conference «Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH – 2017»*, Sevastopol, 2017, pp. 264-268. (In Russ.)]

13. Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М., Соколов А.В. Изменение спектральных и флуоресцентных характеристик галлоцианина при его взаимодействии с хлорноватистой кислотой. *Сб. науч. тр. «VI Конгресс физиков Беларуси»*, Минск, 2017, с. 170-171. [Lutsenko V.E., Grigoryeva D.V., Kozlov S.O., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Sokolov A.V. Spectral and fluorescent characteristics changes of gallocyanine due to its interaction with hypochlorous acid. C*ollection of scientific papers «VI* Kongress fizikov Belarusi*»*, Minsk, 2017, pp. 170-171. (In Russ.)]

14. Malle E., Furtmüller P.G., Sattler W., Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British journal of pharmacology*, 2007, vol. 152, no. 6, pp. 838-854.

15. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. *Молекулярная медицина*, 2013, № 4, с. 3-9. [Obraztsov I.V., Godkov M.A. Chemiluminescent analysis of blood cells in medicine: history, theory, practice. *Molekulyarnaya meditsina*, 2013, no. 4, pp. 3-9. (In Russ.)]

16. Sheppard F R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of leukocyte biology*, 2005, vol. 78, no. 5, pp. 1025-1042.

17. Nagaji J. The role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]i$ in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *The Kurume medical journal*, 1999, vol. 46, no. 3-4, pp. 157-162.

18. Abdel-Latif D., Steward M., Macdonald D.L., Francis G.A., Dinauer M.C., Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 3, pp. 832-839.

19. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое. *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, т. 1, № 3 (109), ч. 2, с. 174-180. [Menshchikova E.B., Zenkov N.K. Modern approaches in the analysis of oxidative stress, or how to measure the immeasurable. *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, vol. 1, no. 3 (109), part 2, pp. 174-180. (In Russ.)]

20. Reichl S., Vocks A., Petković M., Schiller J., Arnhold J. The photoprotein Pholasin as a luminescence substrate for detection of superoxide anion radicals and myeloperoxidase activity in stimulated neutrophils. *Free radical research*, 2001, vol. 35, no. 6, pp. 723-733.

21. Луценко В.Е. Регистрация продукции хлорноватистой кислоты в суспензии активированных нейтрофилов при помощи красителя целестинового синего В. *Сб. работ 74-й науч. конф. студ. и асп. Бел. гос. ун.*, Минск, 2017, ч. 1, с. 132-136. [Lutsenko V. E. Registration of hypochlorous acid production in a suspension of activated neutrophils using celestine blue B. *Sbornik rabot 74-oj nauchnoj konferencii studentov i aspirantov Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta*, Minsk, 2017, part 1, pp. 132-136. (In Russ.)]

22. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудинина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. Активированные нейтрофилы, продуцирующие HOCl, выявляющиеся при проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с помощью целестинового синего В. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2016, т. 1, № 3 (109), ч. 2, с. 86-91. [Kozlov S. O., Kudryavtsev I. V., Grudinina N. A., Kostevich V. A., Panasenko O. M., Sokolov A. V., Vasiliev V. B. Activated neutrophils producing HOCl, been identified by flow cytometry and confocal microscopy using celestine blue B. *Bjulleten VSNC SO RAMN*, 2016, vol. 1, no. 3 (109), part 2, pp. 86-91. (In Russ.)]

23. Gorudko I.V., Mukhortava A.V., Caraher B., Ren M., Cherenkevich S.N., Kelly G.M., Timoshenko A.V. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, vol. 516, no. 2, pp. 173-181.

24. Pereira-da-Silva G., Caroline Carvalho F., Cristina Roque-Barreira M. Neutrophil activation induced by plant lectines: modulation of inflammatory processes. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 2012, vol. 11, no. 6, pp. 433-441.

25. Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J. Lectin-triggered superoxide/H_2O_2 and granule enzyme release from cells. *Methods in Molecular Medicine*, 1998, no. 9, pp. 441–445.

26. Тимошенко А.В. Применение эндогенных лектинов в клинической диагностике. *Медицинские новости*, 1997, № 4, с. 16-20. [Timoshenko A.V. The use of endogenous lectins in clinical diagnostics. *Meditsinskiye novosti*, 1997, no. 4, pp. 16-20. (In Russ.)]

FLUORESCENT METHOD FOR ESTIMENT NEUTROPHILS FUNCTIONAL ACTIVITY

Lutsenko V.E.[1], Grigorieva D.V.[1], Cherenkevich S.N.[1], Panasenko O.M.[2, 3], Sokolov A.V.[2, 4, 5], Gorudko I.V.[1]

[1] Belarusian State University

Ave. Nezavisimosti, 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus; e-mail: nika.lutsenko@tut.by

[2] Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine

Moscow, Russia

[3] Pirogov Russian National Research Medical University

Moscow, Russia

[4] Research Institute of Experimental Medicine

Saint-Petersburg, Russia

[5] Saint Petersburg State University

Saint-Petersburg, Russia

Abstract. The principal possibility of evaluating functional neutrophils activity by fluorescent method using celestine blue B and gallocyanine has been shown. It has been established that in cell suspensions the oxidation of gallocyanine is associated with the production of a superoxide anion radical, and celestine blue B oxidation is associated with the production of reactive halogen species. The possibility of selective detection of reactive oxygen and halogen species using the fluorescent method, when neutrophils are activated by a wide range of agonists of various nature, has been shown with the use of gallocyanine and celestine blue B dye. It has been concluded that these dyes can be used in the development of methods for identifying reactive oxygen and halogen species in cell suspensions, assessing the functional state of neutrophils, developing therapeutic methods of treatment with antioxidants in diseases associated with the development of oxidative/ halogenative stress.

Key words: *neutrophils, oxidative stress, reactive oxygen species, reactive halogen species, gallocyanine, celestine blue B, fluorescence.*

ПЕПТИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ – СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Рогожин Е.А.[1,2]

[1] ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 177997, РФ

[2] ФГБНУ Научно-исследовательский Институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе

Ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1, г. Москва, 119021, РФ; e-mail: rea21@list.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018

Аннотация. В связи с широким распространением полирезистентных патогенных микроорганизмов в мировой медицинской практике высока потребность в антибиотиках, относящихся к химической группе пептидов (в частности, гликопептидов), благодаря их значительной противобактериальной активности в отношении возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью. На данный момент в эту группу антибиотиков в номенклатуре противобактериальных медицинских препаратов входят даптомицин, рамопланин, тейкопланин и ванкомицин. Антибиотики этой группы обладают активностью в отношении грамположительных бактерий и микобактерий, в том числе и *Mycobacterium tuberculosis*. Преимуществом гликопептидных антибиотиков перед рядом антибиотиков других групп является бактерицидный тип действия и высокая активность в отношении микроорганизмов, устойчивых ко многим препаратам, включая β-лактамные антибиотики и фторхинолоны. По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), устойчивость болезнетворных микроорганизмов к антибиотикам является главным вызовом, с которым столкнулось современное здравоохранение. Проблема быстрого распространения устойчивых форм среди патогенных микроорганизмов усугубляется отсутствием у современной медицины достаточного числа эффективных антибиотиков. По данным Всемирной организации здравоохранения в период с 2000 по 2015 год в мире одобрено всего лишь 2 новых природных антибиотика для проведения клинических испытаний.

Ключевые слова: *пептидные антибиотики, антимикробная активность, бактериальные штаммы-продуценты, структура.*

За 85-летний период существования науки об антибиотиках неоднократно менялись основные направления исследований в области изыскания новых природных антибиотиков. После открытия пенициллина поиск продуцентов антибиотиков проводился среди представителей разных таксономических групп. С 1960-х годов на протяжении 30 лет основными продуцентами антибиотиков были актиномицеты. В настоящее время эта группа микроорганизмов хорошо изучена и поэтому в очередной раз изменилось направление поиска новых природных антибиотиков – он проводится не только среди актиномицетов, но также ведется активный поиск среди грибов, бактерий, беспозвоночных, растений и представителей других групп организмов. [1] При этом целью поиска являются виды, мало изученные или не изученные в качестве продуцентов антибиотиков, а также представители широко распространенных видов, выделенных из различных природных источников. К ним относятся редкие виды, виды из необычных биоценозов, например, микроорганизмы-симбионты морских растений и животных, а также организмы, которые ранее не удавалось культивировать в искусственных условиях, например, некоторые виды высших грибов. [2].

Помимо изучения актиномицетов (прокариотических микроорганизмов, также называемых «актинобактериями») важным направлением современных исследований в мировой науке является поиск антибиотиков среди бактерий. Известно, что антибиотики являются вторичными метаболитами, и их наличие не является непременным условием для существования штамма-продуцента. Полиморфность признака образования антибиотика свойственна бактериям. Например, хорошо изученный вид *Bacillus subtilis* (сенная палочка) занимает первое место по числу описанных антибиотиков различной химической природы (около 40), среди которых есть поликетидные антибиотики [3], фосфолипиды [4], полиены [5-7], макролактины [8] и различные пептиды, различающиеся по химической природе, по механизму биосинтеза и по антимикробным спектрам действия. Среди пептидов *B. subtilis* известны сравнительно крупные пептидные антибиотики бактериоцины, обладающие молекулярной массой в десятки тысяч дальтон, характеризующиеся узким антибиотическим спектром и действующие на другие штаммы *B. subtilis*, т.е. выступающие в качестве фактора внутривидовой борьбы, регулирующего популяцию *B. subtilis* [9-11]. Среди бактериоцинов выделяют в самостоятельную группу антибиотики с относительно небольшой молекулярной массой 5-10 кДа, которые называют микроцинами [12]. Среди пептидных антибиотиков *B. subtilis* также выделяют группу соединений лантибиотиков, включающих редкую тиоэфирную аминокислоту лантионин и ее производные, за счет которых в молекуле антибиотика образуются внутренние тиоэфирные связи. Лантибиотикам *B. subtilis*, например, субтилину и эрицину, в отличие от бактериоцинов свойственен широкий антимикробный спектр действия. Субтилин, состоящий из 32 аминокислот и имеющий пентациклическую структуру, близок по структуре к широко применяемому в пищевой

промышленности консерванту низину, образуемому *Lactococcus lactis* [13]. Из ферментированных соевых бобов – традиционного продукта питания корейской кухни, выделен штамм B. subtilis SC-8, проявляющий узкий спектр антимикробного действия в отношении бактерий группы *Bacillus cereus* и способствующий сохранности пищи [14]. У *B. subtilis* также описана большая группа липопептидных антибиотиков широкого спектра действия. Это олигопептиды, синтезируемые на мультиферментных комплексах, к которым затем присоединяются жирные кислоты. По аминокислотной цепочке и по жирной кислоте липопептиды бацилл подразделяются на три семейства. Представители семейства итурина являются гептапептидами с липофильной β-аминокислотой. Они обладают выраженной эффективностью в отношении мицелиальных и дрожжевых фитопатогенных грибов [15-16]. Декапептиды с липофильной β- гидроксикислотой относятся к семейству фенгицина и характеризуются наличием орнитина. Для них характерна эффективность в отношении мицелиальных грибов [17-18]. К третьему семейству относятся сурфактины – гептапептиды с β-гидрокси жирной кислотой, обладающие меньшей эффективностью в отношении грибов, но проявляющие наиболее выраженные гидрофобные свойства среди перечисленных липопептидов, что позволяет образовывать стабильные биопленки на поверхности растений и препятствовать их колонизации другими микроорганизмами. В этом случае антибиотики *B. subtilis* проявляют важную роль в экосистемах, способствую формированию биопленок и колонизации пространства [19-21]. К олигопептидам наименьшей молекулярной массы, содержащим всего по две-три аминокислоты, относятся ризоктицины, которые были выделены как противогрибковые фосфоно-олигопептиды из культуральной жидкости *B. subtilis* ATCC 6633. Эти пептиды содержат небелковую аминокислоту – (Z)-2-амино-5-фосфоно-3-пентеновую кислоту [22]. Такое разнообразие антибиотиков у одной из наиболее изученных бактерий свидетельствует о перспективности данного направления в аспекте фундаментально-ориентированных исследований для нужд медицины, ветеринарии и сельского хозяйства.

Данное исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 14-30-00130).

Список литературы / References:

1. Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*., 2005, vol. 58, pp. 1-26.
2. Chin Y.-W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. Drug Discovery From Natural Sources. *AAPS Journal*, 2006, vol. 8, no. 2, pp. 239-253.
3. Hofemeister J., Conrad B., Adler B., Hofemeister B., Feesche J., Kucheryava N., Steinborn G., Franke P., Grammel N., Zwintscher A., Leenders F., Hitzeroth G, Vater J. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol. Genet. Genomics,* 2004, vol. 272, pp. 363-378.
4. Tamehiro N., Okamoto-Hosoya Y., Okamoto S., Ubukata M., Hamada M., Naganawa H., Ochi K. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *Antimicrob. Agents Chemother*., 2002, vol. 46, pp. 315-320.
5. Zimmerman S.B., Schwartz C.D., Monaghan R.L., Pelak B.A., Weissberger B. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *J. Antibiot*., 1987, vol. 40, pp. 1677-1681.
6. Wilson K.E., Flor J.E., Schwartz R.E., Joshua H., Smith J.L., Pelak B.A., Liesch J.M., Hensens O.D. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physic-chemical characterization. *J. Antibiot*., 1987, vol. 40, pp. 1682-1691.
7. Patel P.S., Huang S., Fisher S., Pirnik D., Aklonis C., Dean L., Meyers E., Fernandes P., Mayerl F. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J. Antibiot*., 1995, vol. 48, pp. 997-1003.
8. Romero-Tabarez M., Jansen R., Sylla M., Lunsdorf H., Häußler S., Santosa D.A., Timmis K.N., Molinari G. 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant *Enterococci,* and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother*., 2006, vol. 50, no. 5, pp. 1701-1709.
9. Егоров Е.С., Баранова И.Н. Бактериоцины: образование свойства, применение. Антибиотики и химиотерапия, 1999, № 6, с. 33-40. [Egorov E.S., Baranova I.N. Bacteriocins: production, properties, application. Antibiotiki I khimioterapiya, 1999, no. 6, pp. 33-40. (In Russ.)]
10. Rea M.C., Ross R.P., Cotter P.D., Hill C. Classification of bacteriocins from gram-positive bacteria// *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. / Eds. Drider D., Rebuffat S. Springer Science+Business Media LLC, 2011, pp. 29-53.
11. Abriouel H., Franz C.M.A.P., Ben Omar N., Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev*., 2011, vol. 35, pp. 201-232.
12. Severinov K., Semenova E., Kazakov T. Class I microcins: Their structures activities, and mechanisms of resistance. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. / Eds. Drider D., Rebuffat S. New York: Springer, 2011, pp. 289-308.
13. Ross R.P., Morgan S., Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol*., 2002, vol. 79, pp. 3-16.
14. Yeo I., Lee N.K., Hahm Y.T. Genome sequencing of *Bacillus subtilis* SC-8, antagonistic to the *Bacillus cereus* group, isolated from traditional korean fermented-soybean food. *J. Bacteriol*., 2012, vol. 194, no. 2, pp. 536-537.

15. Thimon L., Peypoux F., Wallach J., Michel G. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastruture of yeast cell. *FEMS Microbiol. Lett.,* 1995, vol. 128, pp. 101-106.

16. Tsuge K., Akiyama T., Shoda M. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol*., 2001, vol. 183, pp. 6265-6273.

17. Steller S., Vollenbroich D., Leenders F., Stein T., Conrad B., Hofemeister J., Jacques P., Thonart P., Vater J. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem. Biol.,* 1999, vol. 6, pp. 31-41.

18. Vanittanakom N., Loeffer W., Koch U., Jung G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot*., 1986, vol. 39, pp. 888-901.

19. Magnet-Dana R., Thimon L., Peypoux F., Ptak M. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie,* 1992, vol. 74, pp. 1047-1051.

20. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.,* 2004, vol. 134, no. 1, pp. 307-319.

21. Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbio.l Rev.,* 2010, vol. 34, no. 6, pp. 1037-1062.

22. Fredenhagen A., Angst C., Peter H.H. Digestion of rhizocticins to (Z)-L-2-amino-5-phosphono-3-pentenoic acid: revision of the absolute configuration of plumbemycins A and B. *J. Antibiot.,* 1995, vol. 48, no. 9, pp. 1043-1045.

PEPTIDE ANTIBIOTICS - STRUCTURAL FEATURES AND REGULARITIES OF BIOLOGICAL ACTIVITY

Rogozhin E.A.[1,2]

[1] Shemyakin and Ovchinnikov institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences

ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 177997, Russia

[2] Gause Institute of New Antibiotics

ul. Bolshaya Pirogovskaya, 11-1, Moscow, 119021, Russia; e-mail: rea21@list.ru

Abstract. Due to the wide spread of multidrug resistant pathogens in world medical practice, there is a high demand for antibiotics belonging to the chemical group of peptides (in particular, glycopeptides), due to their significant antibacterial activity against multidrug-resistant pathogens. At the moment, this group of antibiotics in the nomenclature of antibacterial medicines includes daptomycin, ramoplanin, teicoplanin and vancomycin. Antibiotics of this group have activity against gram-positive bacteria and mycobacteria, including Mycobacterium tuberculosis. The advantage of glycopeptide antibiotics over a number of antibiotics of other groups is the bactericidal type of action and high activity against microorganisms resistant to many drugs, including β-lactam antibiotics and fluoroquinolones. According to the World Health Organization (WHO), the resistance of pathogens to antibiotics is the main challenge facing modern healthcare. The problem of the rapid spread of resistant forms among pathogenic microorganisms is exacerbated by the lack of a sufficient number of effective antibiotics in modern medicine. According to the World Health Organization, from 2000 to 2015, only 2 new natural antibiotics for clinical trials have been approved worldwide.

Key words: *peptide antibiotics, antimicrobial activity, bacterial strains-producers, structure.*

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АЛИФАТИЧЕСКИХ СЛОЖНЫХ ПОЛИЭФИРОВ В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Синицына Е.С.[1, 2], Коржиков-Влах В.А.[1], Беспалов В.Г.[3], Тенникова Т.Б.[1]

[1] Санкт-Петербургский государственный университет, институт химии
Университетский пр., 26, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ
[2] Институт высокомолекулярных соединений Российской Академии наук
Большой пр. В.О., 31, г. Санкт-Петербург, 199004, РФ
[3] ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова" Министерства здравоохранения Российской Федерации
ул. Ленинградская, 68, г. Санкт-Петербург, 197758, РФ
Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Разработка наноконтейнеров для адресной доставки лекарственных препаратов в соответствующие органы является одним из активно развивающихся направлений биомедицинской химии. В представляемой работе был проведен синтез биодеградируемого блок-сополимера на основе лактида молочной кислоты (ПМК) с метиловым эфиром поли(этиленгликоля)-5000. Полимеризацию проводили по ионно-координационному механизму в расплаве. Для характеризации образов использовали методы ^{1}Н-ЯМР и гель проникающей хроматографии. Полимерные частицы с размером от 40 до 200 нм были получены методом наноосаждения. В процессе формирования в полимерные биодеградируемые контейнеры инкапсулировали цитостатический препарат диоксадэт, который применяется для лечения рака яичников. Эффективность инкапсулирования для разработанных систем варьировалась от 46 до 83 %, максимальное количество инкапсулированного препарата составило 230 мкг/мг полимерных частиц.
***Ключевые слова**: биодеградируемые частицы, доставка лекарств, наноосаждения.*

Разработка наноконтейнеров для адресной доставки лекарственных препаратов в соответствующие органы является одним из активно развивающихся направлений биомедицинской химии. Для формирования биосовместимых частиц был проведен синтез биодеградируемого блок-сополимера на основе лактида молочной кислоты (ПМК) с метиловым эфиром поли(этиленгликоля)-5000 (ПЭГ-5000). Выбор мономеров определялся способностью под действием ферментов к деградации блока ПМК, а также стабилизирующей ролью ПЭГ в водной среде для сформированных частиц. Образцы сополимера были получены полимеризацией с раскрытием цикла по ионно-координационному механизму в расплаве при 135 ^{0}С и соотношении мономер (лактид молочной кислоты) / катализатор равном 1000 (рис. 1). Соотношение лактида молочной кислоты к ПЭГ-5000 варьировали от 300 до 1500. Время реакции составило 6 минут. Для определения химического состава и подтверждения структуры блок-сополимера был использован метод 1Н-ЯМР. В полученном протонном спектре зарегистрировано наличие сигналов при 1,6 м.д., относящийся к протонам метильной группы ПМК, 3,75 м.д., отвечающих за метиленовые группы ПЭГа, а также мультиплет при 5,25 м.д., соответствующий наличию в образце энантиомерных групп во фрагменте полимолочной кислоты. Определение среднечисловой и среднемассовой молекулярной массы и константы полидисперсности ПМК-ПЭГ-5000 проводились методом гель проникающей хроматографии. Измерения были проведены на установке Shimadzu LC-20 Prominence с рефрактометрическим детектором RID 10-A (Япония). Для построения калибровочной зависимости использовали полистирольные стандарты. По данным гель проникающей хроматографии среднечисловая молекулярная масса образцов сополимера составили: 42000 и 96000; среднемассовая молекулярная масса образцов полимера 52000 и 133000, а индексы полидисперсности 1,2 и 1,4 соответственно.

В начале 90-х годов была разработана технология наноосаждения как простой одностадийный процесс получения полимерных частиц [1]. Как правило, система для наноосаждения состоит из трех основных компонентов: полимера (синтетического или природного), органического растворителя и осадителя (чаще всего воды). Подбор исходных соотношений компонентов происходит на основании растворимости полимера в выбранном растворителе, степени смешивания растворителя с водой, а также легкости его удаления из системы. Типичные органические растворители, которые чаще всего используются для наноосаждения: ацетон, ацетонитрил и тетрагидрофуран [2]. Процесс наноосаждения заключается в осаждении растворенного полимера в виде наноразмерных частиц в результате смешения органической фазы, в которой был растворен полимер с фазой, в которой полимер имеет плохую растворимость. При определенных концентрациях полимера, растворителя и воды в системе образуется термодинамически метастабильная область – «область узо», что приводит к образованию стабильных полимерных наноразмерных частиц [3]. «Эффект узо» возникает между границами кривой бинодали (граница предельного перехода, соответствующая пределу смешиваемости в зависимости от состава системы) и границ спинодали (границы предела устойчивости, которая разделяет область осаждение полимера из-за его нерастворимости в водной фазе) [4]. Схема получения полимерных частиц методом наноосаждения представлена на рисунке 2. Применение метода наноосаждения имеет ряд

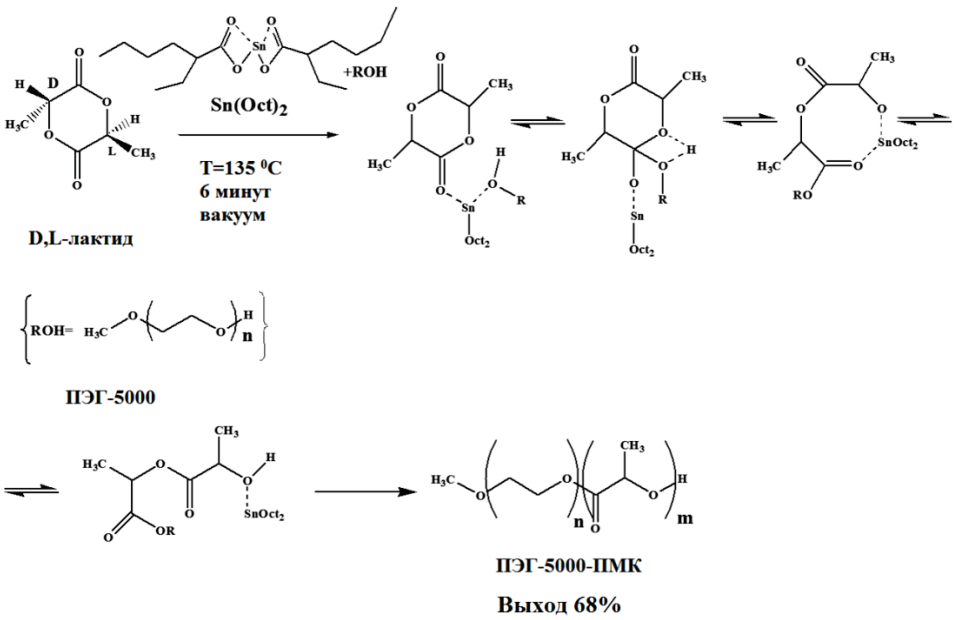


Рисунок 1. Получение сополимера ПМК-ПЭГ-5000 полимеризацией с «раскрытием цикла»

существенных преимуществ перед другими методами формирования частиц: во-первых, процесс наноосаждения происходит без внешних затрат энергии, необходимых для формирования наночастиц другими методами (не требуется ультразвуковая обработка), а также без использования поверхностно-активных веществ и характеризуется относительно простой и воспроизводимый техникой для приготовления наноконтейнеров.

В рамках представляемого исследования изучали влияние изменения концентрации компонентов в системе, соотношения доли органической фазы к водной фазе, скорости ввода органической фазы и скорости перемешивания в водной фазе на физико-химические свойства получаемых полимерных частиц. Концентрацию полимера в органической фазе варьировали от 0,5 до 10%. Соотношение органической фазы к водной было 1:2 и 1:5. Скорость перемешивания изменяли от 500 до 1000 об/мин, а скорость введения органической фазы в водную составляла от 0,5 до 5 мл/мин. Средний размер частиц и индекс полидисперсности оценивали методом динамического рассеивания света. В результате были получены полимерные частицы с размером от 40 до 200 нм, индекс полидирспесности имел значения от 0,05 до 0,18. Выход полимерных частиц в исследованных системах соответствовал от 70 до 98 %.

Разрабатываемые биодеградируемые полимерные контейнеры могут быть использованы для доставки лекарственных препаратов к органам – мишеням. В настоящее время рак яичников является одним из наиболее распространённых онкологических заболеваний.

При стандартных схемах химиотерапии рака яичников лекарственные препараты вводятся системно: внутривенно, реже – перорально. В качестве альтернативного подхода для проведения химиотерапии при рак яичников сегодня рассматривается возможность внутрибрюшинного введения полимерных частиц с инкапсулированным цитостатическим препаратом так называемая интраперитонеальная химиотерапия. Аргументами для назначения локальной химиотерапии является меньшая токсичность для организма, при сравнении системной химиотерапии проводимой внутривенно, а также характерная особенность рака яичников

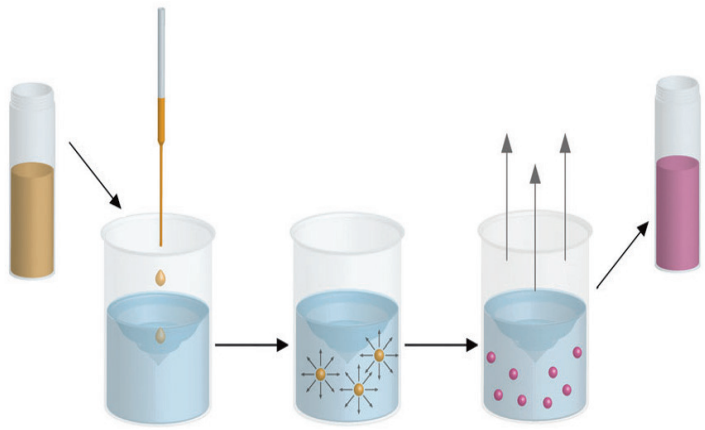


Рисунок 2. Схема получения полимерных частиц методом наноосаждения

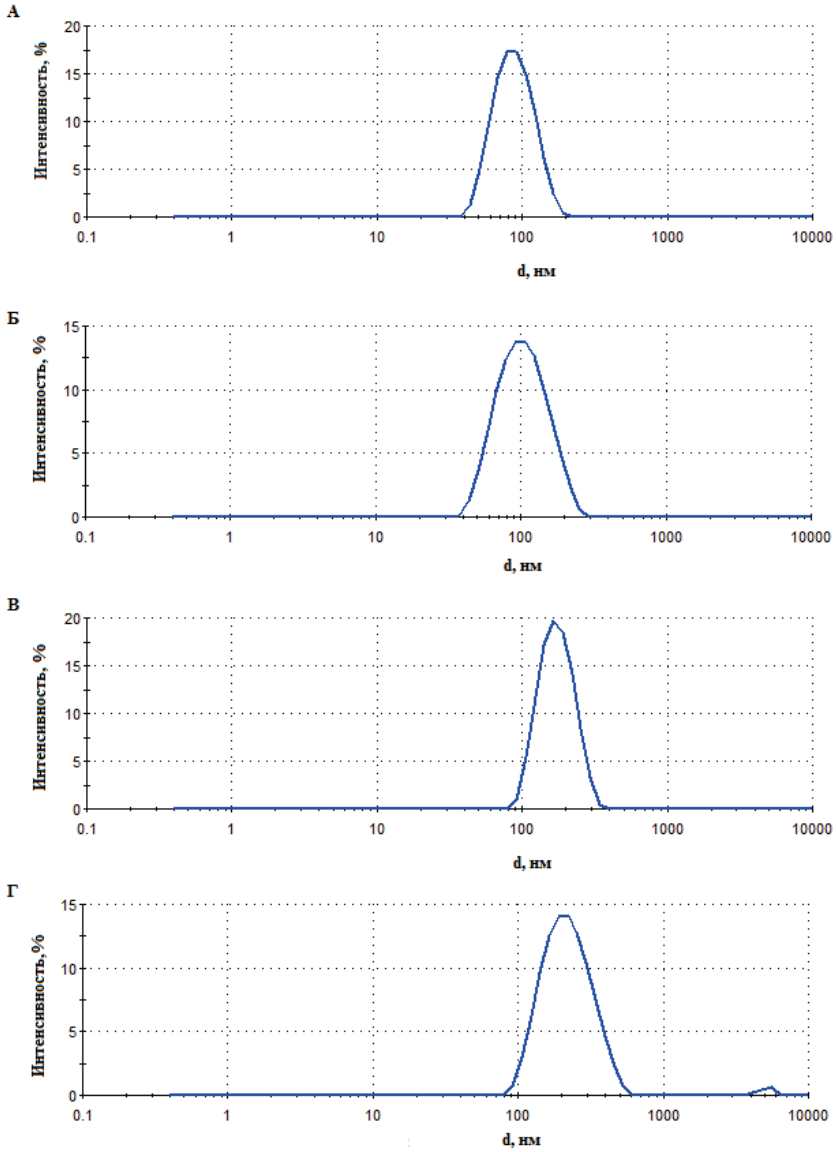


Рисунок 3. Кривые распределения по размерам для полученных частиц

метастазировать по поверхности брюшины в пределах брюшной полости. Основными требованиями при интраперитонеальная химиотерапия являются следующие: противоопухолевый препарат, инкапсулированный в полимерные наноконтейнеры, должен пролонгированно высвобождаться из частиц и медленно выводиться из брюшной полости. Также при высвобождении лекарственный препарат должен проявлять активность в отношении конкретной опухоли. К полимерным частицам, предназначенным для описанной цели, выдвигается важное условие, они должны полностью подвергаться метаболизму с образованием нетоксичных метаболитов при прохождении через печень. В рамках проекта цитостатический препарат – диоксадэт инкапсулировали в процессе формирования частиц на основе ПЭГ-5000-ПМК. На рисунке 3 представлены данные о размерах частиц в зависимости от количества инкапсулированного лекарственного препарата. Установлено, что при исходной концентрации 5 мг/мл сополимера ПЭГ-5000-ПМК в ацетонитриле и соотношении органической фазы к водной 1:5, размер частиц без препарата составляет - 80 нм (рис. 3А), при загрузки 43 мкг/мг полимерных частиц – 95 нм (рис. 3Б), при 145 мкг/мг полимерных частиц -165 нм (рис. 3В), при введении 230 мкг/мг - 205 нм (рис. 3Г). Показано, что все полученные полимерные частицы характеризуются наличием унимодального распределения по размерам. Увеличение количества инкапсулированного диоксадэта приводит к уменьшению значения дзета-потенциала с -24 до -12 Мв.

На рисунке 4 представлена зависимость эффективности инкапсулирования (ЭИ) от первоначальной загрузки диоксадэта. Эффективность инкапсулирования в системе снижается при увеличении количества загружаемого лекарственного препарата. При первоначальной загрузке – 2,5 мг диоксадэта, ЭИ составила -83%, на 1 мг полимерных частиц составила - 43 мкг, при 12,5 мг - ЭИ была -58 %, при этом на 1 мг частиц было введено -145 мкг лекарства, при 25 мг ЭИ - 46 %, а загрузка на 1 мг полимерного носителя составила -230 мкг.

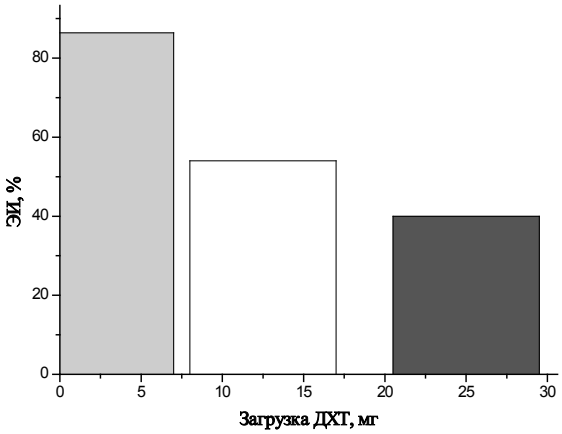


Рисунок 4. Зависимость эффективности инкапсулирования от загрузки диоксадэта

В предварительных экспериментах по инкапсулированию диоксадэта показано, что данный цитостатический препарат включается в разрабатываемые полимерные наноконтейнеры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда проект №14-50-00069, направление 05-109.

Список литературы / References:

1. Rao J.P., Geckeler K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.*, 2011, vol. 36, no. 7, pp. 887-913.

2. Makadia H.K., Siegel S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 1377-1397.

3. Lepeltier E., Bourgaux C., Couvreur P. Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014, vol. 71, pp. 86-97.

4. Beck-Broichsitter M. [et al.] Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the “ouzo region” upon drug loading. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2010, vol. 41, no. 2, pp. 244-253.

BIODEGRADABLE NANOPARTICLES BASED ON ALIPHATIC POLYESTER AS DRUG DELIVERY SYSTEM

Sinitsyna E.S.[1, 2], Korzhikov-Vlakh V.A.[1], Bespalov V.G.[3], Tennikova T.B.[1]

[1] Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University
Universitetskii pr. 26, St. Petersburg, 198504, Russia
[2] Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences
Bolshoy pr. 31, St. Petersburg, 199004, Russia
[3] N.N. Petrov Research Institute of Oncology of the Ministry of Health
Leningradskay Street 68, St. Petersburg, 197758, Russia

Abstract. The preparation of nanocontainers for targeted drug delivery is a rapidly developing field of biomedical chemistry. The synthesis of biodegradable block copolymer of polyethylene glycol (PEG-5000) with polylactic acid (PLA) was performed via stannous octoate initiated ring-opening polymerization in bulk. Molecular weights and molecular weight distribution of obtained polymer were studied by Size exclusion chromatography (SEC). For the characterization of obtained samples 1H-NMR was used. Polymer particles with the sizes from 40 to 200 nm were prepared by nanoprecipitation method. Dioxadet was encapsulated in biodegradable polymer containers this cytotoxic drug used for the treatment of ovarian cancer. The encapsulation efficiency for the developed systems ranged from 46 to 83%, the loading content was equal to 230 μg mg^{-1} of particles.

***Key words**: biodegradable particles, drug delivery, nanoprecipitation.*

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ И СООТНОШЕНИЯ ПИГМЕНТОВ В КУЛЬТУРЕ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПОВЕРХНОСТНОЙ ОСВЕЩЁННОСТИ

Боровков А.Б., Гудвилович И.Н.

Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: spirit2000sev@yandex.ru; gudirina2008@yandex.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Исследованы особенности динамики содержания пигментов и их соотношения в накопительной культуре *D. salina* при различной поверхностной освещённости. Показано, что изменение поверхностной освещённости в диапазоне 60-250 Вт/м^2 оказывает влияние как на содержание хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов в культуре *D. salina*, так и на их соотношение. Так, повышение освещённости от 60 до 250 Вт/м^2 приводит к увеличению соотношения Кар/Хл а в 1,4-1,7 раза.

***Ключевые слова**: Dunaliella salina; накопительное культивирование; поверхностная освещённость; хлорофилл a; каротиноиды.*

Зелёная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. широко известна как один из наиболее перспективных природных источников β-каротина. Ещё в 60-х годах 20 в. Н.П. Масюк был предложен двухэтапный метод культивирования *D. salina* в открытых бассейнах, в основе которого лежит метод периодических культур. предусматривающий на первом этапе создание условий, способствующих накоплению биомассы микроводоросли, а на втором – инициирующих накопление β-каротина в её клетках [1]. Известно, что перестройка пигментного аппарата дуналиеллы и переход к накоплению в её клетках β-каротина происходит под действием стрессовых факторов, важнейшим из которых признан световой фактор [1-5]. Однако, этот переходный процесс сопровождается гибелью определённой части клеток культуры, вплоть до её полной гибели. Поэтому большое значение имеет физиологическое состояние культуры на этом этапе; она должна быть подготовлена к воздействию стрессовых факторов. Известно, что одним из показателей физиологического состояния культуры является содержание пигментов и, особенно, их соотношение: так, для успешного перевода культуры на вторую стадию под воздействие стрессовых факторов, доля каротиноидов, пигментов, защищающих клетку от стрессового воздействия света, должна быть увеличена по сравнению с их содержанием в культуре на первой стадии активного роста [4, 6, 7]. Поэтому целью работы было выявить особенности накопления и соотношения пигментов в культуре *D. salina* при переходе от первого ко второму этапу её выращивания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IMBR-2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФГБУН ИМБИ), культуру которой выращивали в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочей толщиной 5 см. Культуру *D. salina* выращивали в накопительном режиме на модифицированной питательной среде по [5]. Модификация заключалась в добавлении морской соли до 120 г·дм$^{-3}$. Температура при выращивании составляла – 27-29 °С, pH среды – 7-8 единиц. На первом этапе освещенность рабочей поверхности культиваторов составляла 80 Вт/м^2. После достижения культурой стадии замедления роста, она была разбавлена в 3 раза средой без добавления азота и фосфора и перераспределена в пять культиваторов с поверхностной освещённостью 60, 100, 150, 200 и 250 Вт/м^2. В процессе выращивания культура снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3 % по объему.

Содержание сухого вещества в культуре (СВ) определяли объемно-весовым [8], а также фотометрическим методом [9]. Количественное определение содержания пигментов проводили спектрофотометрическим методом [9]. Хлорофиллы и каротиноиды экстрагировали из клеток 100% ацетоном. Спектры экстрактов пигментов регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400-800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным [10] по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения соответствующих пигментов. Рассчитывали средние арифметические ($\overline{X}$), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ($\pm\Delta\overline{X}$). Все расчёты проводили для уровня значимости α=0,05; в таблицах и на графиках представлены средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Начальная плотность культуры *D. salina* для всех вариантов эксперимента составляла 0,54-0,58 г СВ/л. За первые 2 суток выращивания плотность культуры выросла, причём прирост биомассы для вариантов с

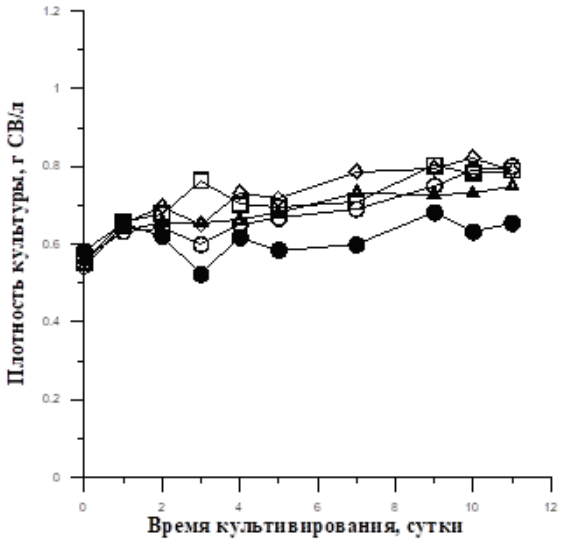


Рисунок 1. Плотность культуры *D. salina* при различной освещённости: ● – 250 Вт/м^2, ○ – 200 Вт/м^2, ◊ - 150 Вт/м^2, ▲ – 100 Вт/м^2, □ – 60 Вт/м^2

освещённостью 150-250 Вт/м^2 был незначительным и составил, в среднем, около 10 % (0,04-0,07 г СВ/л). Для вариантов эксперимента с более низкой освещённостью (60 и 100 Вт/м^2) этот показатель был выше в 2 раза (0,1-0,13 г СВ/л) (рис. 1).

Следует отметить, что при разбавлении культуры использовали среду без добавления минеральных солей азота и фосфора, поэтому прирост культуры определялся остаточным количеством биогенов в маточной культуре. Свет является важнейшим фактором, определяющим продукционные свойства культур микроводорослей, которые являются фототрофными организмами. Зависимость жизнедеятельности водорослей, в частности, фотосинтеза от освещённости может выражаться как в лимитировании, так и в ингибировании их роста [4, 5], что по-видимому и наблюдалось в эксперименте с увеличением поверхностной освещённости. Наиболее неблагоприятные условия для культуры *D. salina* были в варианте с максимальной освещённостью, где за 5 суток общий прирост плотности культуры оказался нулевым. Таким образом, созданные условия обеспечили нахождение культуры на стадии замедления роста и стационарной, а резкое повышение освещённости было необходимым условием перестройки пигментного аппарата, поскольку ведущим фактором каротиногенеза *D. salina* признан световой на фоне дефицита минерального обеспечения [1, 2, 5].

Небольшой рост плотности культуры *D. salina* в первые сутки для всех вариантов эксперимента сопровождался увеличением содержания Хл *a* (на 25-35 %), а содержание суммарных Кар при этом значительно не изменилось (рис. 2).

На 5-е сутки содержание Хл а в культуре уменьшилось, причём, максимальное снижение по сравнению с первоначальным (на 35-40 %) отмечено для вариантов с освещённостью 150-250 Вт/м^2. Следует отметить, что на всех этапах эксперимента прослеживалась зависимость содержания Хл *a* в культуре от поверхностной освещённости: с увеличением последней – концентрация пигмента понижалась. Что касается суммарных Кар, то их содержание в культуре было более стабильным и чёткой зависимости от освещённости выявить не удалось.

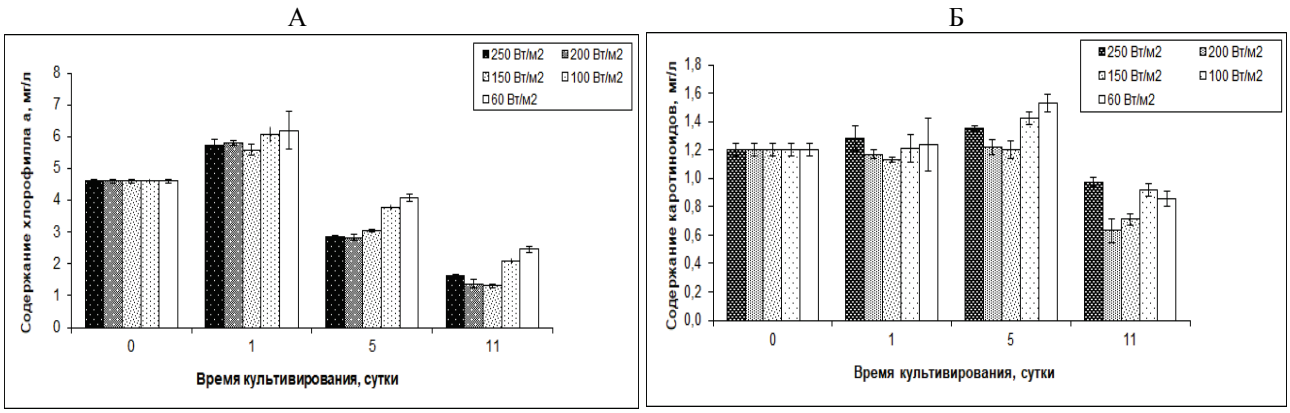


Рисунок 2. Содержание хлорофилла *a* (А) и суммарных каротиноидов (Б) в культуре *D. salina* при различной поверхностной освещённости

Таблица 1. Соотношение Кар/Хл а в культуре *D. salina* при различной поверхностной освещённости

Время выращивания, сут	Соотношение Кар/Хл а				
	250 Вт/м^2	200 Вт/м^2	150 Вт/м^2	100 Вт/м^2	60 Вт/м^2
0	0,26				
1	0,22	0,22	0,21	0,19	0,20
5	0,48	0,45	0,42	0,38	0,35
11	0,60	0,50	0,52	0,46	0,36

В процессе эксперимента изменялось не только содержание пигментов в культуре *D. salina*, но и их соотношение Так, к 11-м суткам эксперимента значение соотношения Кар/Хл *a* увеличилось для всех вариантов. Наибольший рост соотношения Кар/Хл а (в 2,3 раза) отмечен для варианта с максимальной поверхностной освещённостью, а наименьший (в 1,4 раза) – при 60 Вт/м^2 (табл. 1).

Следует отметить, что на изменение соотношения Кар/Хл *a* в культуре *D. salina* также оказывала влияние величина поверхностной освещённости: так с её повышением от 60 до 250 Вт/м^2 соотношение Кар/Хл *a* увеличивалось в 1,4 и в 1,7 раза на 5-е и 11-е сутки соответственно.

Таким образом стационарная стадия роста культуры *D. salina* характеризовалась уменьшением содержания Хл *a* (в 1.9-2.0 раза по сравнению с первоначальным уровнем) и более стабильным содержанием суммарных Кар в культуре. Показано, что увеличение поверхностной освещённости от 60 до 250 Вт/м^2 на стационарной фазе выращивании *D. salina* оказывало разнонаправленное действие на содержание Хл *a* в культуре и соотношение Кар/Хл *a*: так, рост освещённости вызывал характерное для реакции водорослей на стрессовое воздействие увеличение соотношения Кар/Хл *a* (в 1,4-1,7 раза). Это свидетельствует об адаптации культуры *D. salina* к изменившемуся уровню освещённости и подготовке к переходу на стадию каротиногенеза.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания ФГБУН ИМБИ АААА-А18-118021350003-6.

Список литературы / References:

1. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod*. Киев: Наук. думка, 1973, 487 с. [Masjuk N.P. *Morphologija, sistematika, ekologija, geographicheskoe rasprostranenie roda Dunaliella Teod*. Kiev: Nauk. dumka, 1973, 487 p. (In Russ.)]

2. Боровков А.Б., Гудвилович И.Н. Апробация двухстадийного выращивания *Dunaliella salina* Teod. в полупромышленных условиях. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13). URL: http://algology.ru/1155. [Borovkov A.B., Gudvilovich I.N. The testing of two-stage cultivation of *Dunaliella salina* Teod. in semi-industrial conditions. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2017, no. 1 (13). URL: http://algology.ru/1155. (In Russ.)]

3. Ben-Amotz A. New mode of Dunaliella biotechnology: two-phase growth for β-carotene production. *J. of Appl. Phycol*., 1995, vol. 7, pp. 65-68.

4. Lamers P.P., Van de Laak C.C.W., Kaasenbrood P.S. et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol. and Bioeng*., 2010, vol. 106, no. 4, pp. 638-648.

5. Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A. Effect of ingibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β-carotene in *Dunaliella bardawil*. *Plant. Cell. Physiol*., 1990, vol. 31, no. 5, pp. 689-696.

6. Гудвилович И.Н., Боровков А.Б., Тренкеншу Р.П. Опыт выращивания микроводорослей-продуцентов БАВ в полупромышленных условиях. *«Современные технологии продуктов питания»: сб. науч. статей материалы 2-й Междунар. науч.-практич. конф.* Курск: Юго-Зап. гос. ун-т, ЗАО «Университетская книга», 2015, с. 44-50. [Gudvilovich I.N., Borovkov A.B., Trenkenshu R.P. The experience of growing microalgae-producer BAS in semi-industrial conditions. *«Sovremennie technologii produktov pitanija»: Proceedings of 2-ĭ International Science Practical Conference.* Kursk: ZAO «Universitetskaja kniga», 2015, pp. 44-50. (In Russ.)]

7. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н. [и др.] Влияние pH и CO_2 на рост и метаболизм микроводоросли *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens. Физиология растений*, 2016, т. 63, № 4, с. 601-614. [Minjuk G.S., Chelebijeva E.S., Chubchikova I.N. et al. The influence pH и CO_2 on growth and metabolism of microalgae *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens. Phiziologija rasteniy*, 2016, vol. 63, no. 4, pp. 601-614. (In Russ.)]

8. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. *Биология моря*, 1979, № 51, с. 41-46. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. The influence of elements of mineral nutrition on productivity of algae *Platymonas viridis* Rouch. *Biologija morja*, 1979, no. 51, pp. 41-46. (In Russ.)]

9. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике.* Киев: Наук. думка, 1975, 247 с. [Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.Ph. [et al.] *Metodi phiziologo-biochimicheskogo issledovanija vodorosley v gidrobiologicheskoy praktike.* Kiev: Nauk. dumka, 1975, 247 p. (In Russ.)]

10. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Phys*., 1994, vol. 144, pp. 307-313.

SPECIALITY OF PIGMENTS ACCUMULATION AND ITS RATIO IN *DUNALIELLA SALINA* TEOD. CULTURE UNDER DIFFERENT SURFACE IRRADIANCE

Borovkov A.B., Gudvilovich I.N.

The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: spirit2000sev@yandex.ru; gudirina2008@yandex.ru

Abstract. The speciality of pigments accumulation and its ratio in batch culture of *D. salina* under the different level of cultivator's operational surface irradiance were researched. It is experimentally shown, that the variation of cultivator's the irradiance level in the range 60-250 Watt·м$^{-2}$ influenced on pigments content and total carotenoids in *D. salina* culture, as well as on its ratio. Thus, surface irradiance increase by a factor of 4,2 (from 60 to 250 Watt·м$^{-2}$) caused 1,4-1,7 times growth of Car/Chl *a* ratio.

Key words: *Dunaliella salina; batch cultivation; surface irradiance; chlorophyll a; carotenoids.*

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ СВОЙСТВ И ДРУГИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПРОМЫШЛЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ВОДНОПРОПИЛЕНГЛИКОЛЕВЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Волков В.А.[1], Ли Ю.С.[2], Воронков М.В.[3], Лапина Г.П.[3], Завьялов А.Ю.[1], Мисин В.М.[1]

[1] ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
г. Москва, РФ
[2] ООО «Завод эндокринных ферментов»
г. Москва, РФ
[3] ФГБОУ ВО Тверской государственный университет
г. Тверь, РФ; e-mail: vl.volkov@mail.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Исследованы физико-химические свойства наиболее востребованных в косметической промышленности видов воднопропиленгликолевых экстрактов растений, содержание в них флавоноидов и антирадикальных антиоксидантов и стабильность этих веществ при хранении. Проведен корреляционный анализ полученных результатов. Полученные данные могут быть использованы при разработке методов производственного контроля.
Ключевые слова: *антиоксиданты, флавоноиды, пропиленгликолевые экстракты, ДФПГ, амперометрия.*

Большая часть сведений о растительных экстрактах, опубликованных в научной литературе, а также методик их анализа, относится к водно-этанольным или CO_2-извлечениям. Однако, в связи с неприменимостью этанола в большинстве косметических композиций, для извлечения веществ со средней и высокой полярностью, в том числе фенольных антиоксидантов (флавоноиды и их гликозиды, фенолкарбоновые и оксикоричные кислоты, стильбены, ауроны, халконы и др), применяются экстрагенты на основе 1,2-пропиленгликоля. Получаемые таким образом экстракты пока остаются малоизученными с химической точки зрения.

При этом, в спецификациях на экстракты, как правило, приводятся лишь сведения, требуемые действующими нормативно-правовыми актами, но не связанные с их биологической активностью (плотность, показатель преломления, массовая доля нелетучих веществ). Процент сухого остатка, хотя и характеризует степень насыщенности продукта экстрактивными веществами, тем не менее, напрямую не характеризует их полезные свойства, и, вследствие длительности исполнения, неприменим в качестве метода экспресс-контроля производственного процесса.

В большей части фармакопейных статей Государственной фармакопеи РФ, посвященных лекарственному растительному сырью, в качестве основного метода количественного контроля содержания биологически активных соединений приводится анализ флавоноидов, основанный фотометрировании комплекса этих веществ с катионом Al^{3+} в диапазоне длин волн 408-415 нм [1]. Комплекс с $AlCl_3$ даёт смещение максимума поглощения с 350-380 нм на 50 нм в длинноволновую область (батохромный сдвиг) [2].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экстракция сухого лекарственного растительного сырья 50 % водным 1,2-пропиленгликолем осуществлялась при массовом отношении сырья и экстрагента 1:19 при температуре 50 °С в течение 4 часов в условиях постоянного перемешивания.

Количественный анализ антирадикальных АО осуществлялся по методу, основанному на спектрометрическом наблюдении за их взаимодействием со стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом, а также с помощью амперометрии (прибор ЦветЯуза-01-АА) [3, 4]. Анализ флавоноидов проводился по модифицированной методике Государственной фармакопеи XIII издания, основанной на комплексообразовании некоторых групп флавоноидов с катионом Al^{3+} (в качестве реакционной среды служила смесь воды и пропиленгликоля в объемном отношении 1:1) [3, 4]. Измерение содержания сухого остатка также проводилось по модифицированной методике по методике Государственной фармакопеи XIII издания, температура выпаривания экстрагента, учитывая температуру кипения 1,2-пропиленгликоля, была повышена до 184-189 °С.

Исследование стабильности концентрации флавоноидов осуществляли при хранении экстрактов при комнатной температуре. Стабильность концентрации антирадикальных АО исследовалась при хранении экстрактов в холодильнике при 4 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

УФ-спектроскопические характеристики всех исследованных экстрактов в диапазоне длин волн свыше 250 нм определяются наличием фенольных соединений [5] (рис. 1), которые дают характерный пик около 270 нм, в спектрах некоторых экстрактов несколько смещенный в длинноволновую (шалфей, сабельник) или коротковолновую область (календула). В области 310-370 нм большинство экстрактов также имеют пик или плечо. Несмотря на общие черты, формы спектров достаточно индивидуальны и могут быть использованы в качестве одного из критериев подлинности экстракта и сырья [6].

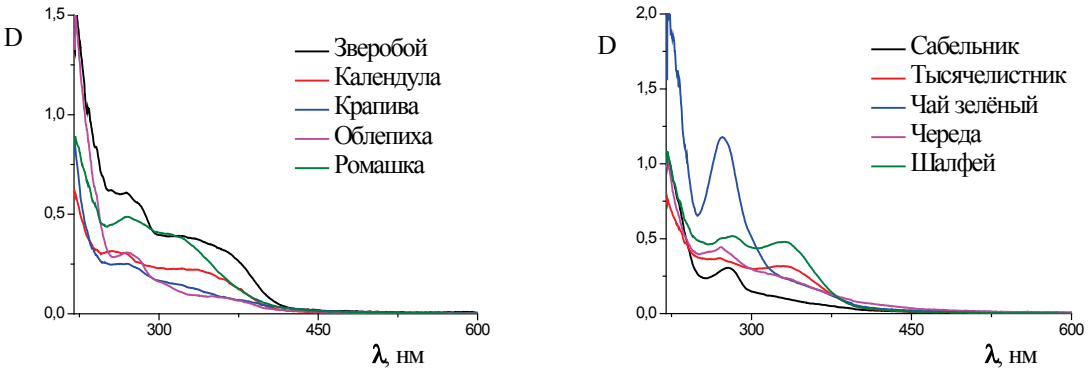


Рисунок 1. УФ-спектры исследуемых воднопропиленгликолевых экстрактов лекарственных растений при 100-кратном разбавлении

Повторяемость форм спектральных кривых и значений длин волн максимумов и минимумов поглощения в спектрах экстрактов ромашки аптечной, полученных из сырья разных партий от разных поставщиков, продемонстрирована на рисунке 2 и в таблице 1.

Данные, приведенные в таблице 1, демонстрируют, что более высокие значения оптических плотностей в максимумах соответствуют экстрактам, содержащим большее количество флавоноидов и сухого остатка. Результаты исследования по всем вышеназванным параметрам были значительно выше у экстракта, приготовленного из сырья, более качественного по внешним признакам (рис. 3, слева). Сырье более низкого качества, кроме того, характеризовалось иным соотношением оптических плотностей в максимумах спектра экстракта ромашки (п. 2 табл. 1).

Полосы поглощения большинства фенольных соединений имеют большую ширину и сильно перекрываются. Главные максимумы в спектрах поглощения фенольных соединений определяются $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в сопряженных ароматических системах, интенсивность которых коррелирует с длиной цепи сопряжения и наличием заместителей. Поэтому молярные коэффициенты экстинкции этих веществ в близких по величине длины волны максимумах также имеют значения в пределах одного порядка. Это позволяет проводить их количественную оценку методом прямого фотометрирования относительно калибровочного графика какого-либо стандартного образца, что очень удобно для текущего контроля производственных процессов вследствие простоты и экспрессности (рис. 4).

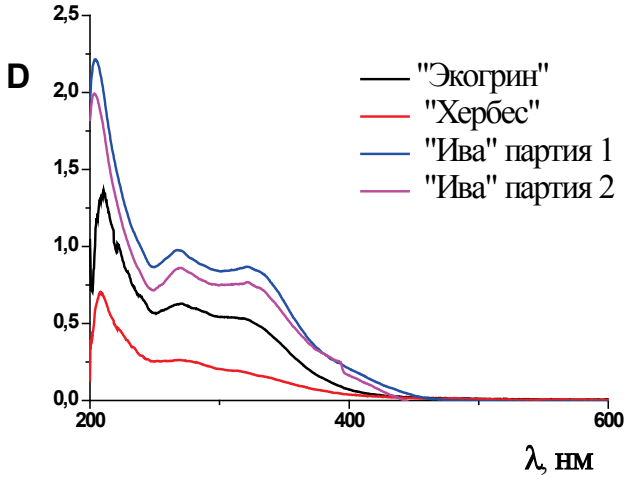


Рисунок 2. Повторяемость спектральных кривых воднопропиленгликолевых экстрактов ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), полученных из сырья разных производителей

Таблица 1. Физико-химические показатели воднопропиленгликолевых экстрактов ромашка аптечной (Matricaria chamomilla L.), полученных из сырья разных производителей

№ п/п	Производитель сырья	Время экстракции, ч	D_{max1}*	D_{300nm}*	D_{321nm}*	D_{max1}/D_{321}	Масса сухого остатка, %	Содержание флавоноидов, мг/л (по рутину)
1	ООО «Экогрин»	4	0,63 (271 нм)	0,54	0,53 (плечо)	1,19	0,79	0,23
2	ООО «Хербес»	4	0,26 (266 нм)	0,19	0,18 (плечо)	1,44	0,40	0,08
3	ООО «ИВА» (партия 1)	3	0,98 (267 нм)	0,84	0,87	1,13	1,33	0,82
4	ООО «ИВА» (партия 2)	4	0,86 (270 нм)	0,75	0,77	1,12	-	-

*Значения оптических плотностей измерены при 100-кратном разбавлении исходного экстракта.

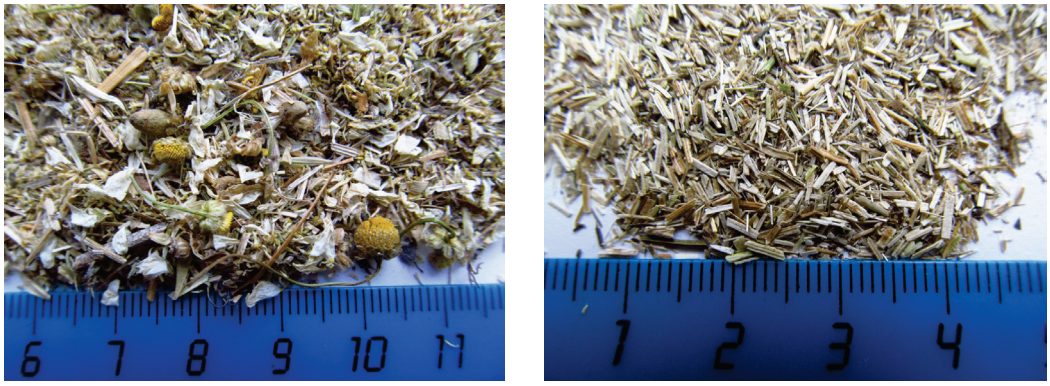


Рисунок 3. Сравнительная оценка по внешним признакам качества сырья ромашки аптечной использованного для получения экстрактов. Слева – ООО «Экогрин», справа – ООО «Хербес»

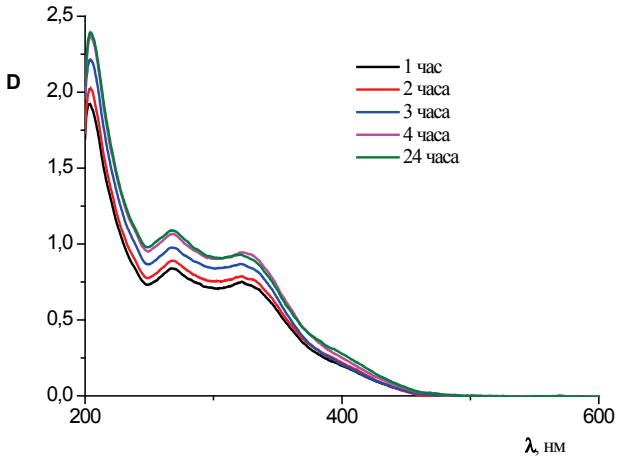


Рисунок 4. Нарастание интенсивности спектров поглощения фенольных соединений ромашки аптечной в ходе экстракции 50%-ным водным пропиленгликолем при температуре 50°С

Очевидно, что при выбранных условиях процесс экстракции через 4 часа после начала можно считать практически завершенным.

С целью сравнительной оценки физико-химических свойств воднопропиленгликолевых экстрактов, были проведены исследования, результаты которых представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты исследования физико-химических характеристик и содержания биологически активных веществ в воднопропиленгликолевых экстрактах 10 лекарственных растений

№ п.п.	Наименование и использованная часть растения	% сухого в-ва	Концентрация флавоноидов мг/л (в сравнении со стандартным образцом рутина)	$D_{270\ nm}$	Содержание антиоксидантов, мг/л (в сравнении со стандартным образцом галловой кислоты)	
					ДФПГ-тест	амперометрия
1	Зверобой продырявленный (трава)	0,94	734	0,61	1110	304
2	Календула лекарственная (цветки)	0,91	276	0,3	124	213
3	Крапива двудомная (листья)	0,63	62	0,25	7,6	312
4	Облепиха крушиновидная (плоды)	0,61	95	0,3	660	232
5	Ромашка аптечная (цветки)	0,66	230	0,49	32	230
6	Сабельник болотный (трава)	0,37	38	0,3	730	150
7	Тысячелистник обыкновенный (трава)	0,52	285	0,37	254	192
8	Чай зеленый (листья)	1,51	258	1,17	2790	697
9	Череда трехраздельная (трава)	0,86	109	0,44	54	245
10	Шалфей лекарственный (листья)	0,72	385	0,5	580	220

Таблица 3. Коэффициенты парной корреляции (Пирсона) между измеренными параметрами воднопропиленгликолевых экстрактов разных растений

	% сухого в-ва	Концентрация флавоноидов	D_{max} при 270 нм	Содержание антиоксидантов по амперометрии
Содержание антиоксидантов по ДФПГ	0,74	0,26	0,89	0,85
Содержание антиоксидантов по амперометрии	0,88	0,13	0,90	-
D_{max} при 270 нм	0,87	0,35	-	-
Концентрация флавоноидов	0,35	-	-	-

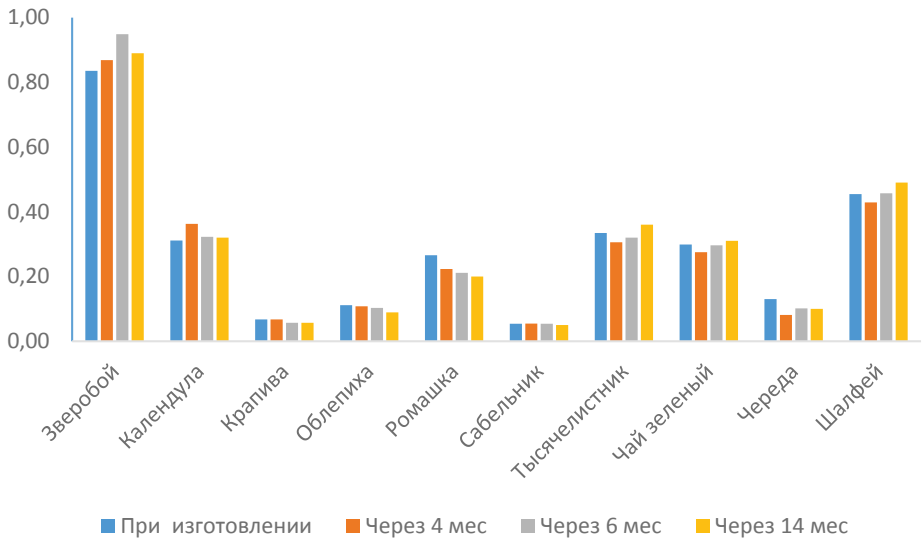


Рисунок 5. Динамика содержания флавоноидов в воднопропиленгликолевых экстрактах при хранении при 4 ℃ по данным фотометрического анализа комплексов с хлоридом алюминия.

Данные о содержании антиоксидантов, оптической плотности на 270 нм и относительному содержанию сухого остатка демонстрируют тесную корреляционную связь. Однако, показатель содержания флавоноидов не коррелирует ни с одним из этих параметров (табл. 3), хотя флавоноиды относятся к антиоксидантам и имеют интенсивные полосы поглощения на длине волны 270 нм. Таким образом, флавоноиды, образующие комплекс с катионом алюминия, поглощающий при 414 нм, не являются определяющими для антирадикальных и антиоксидантных свойств воднопропиленгликолевых экстрактов растений.

Исследования стабильности содержания флавоноидов, проведенные на протяжении 14 месяцев хранения при комнатной температуре (рис. 5), продемонстрировали отсутствие статистически значимых изменений вышеприведенных параметров, что позволяет осуществлять хранение экстрактов в течение указанного срока при сохранении полезных свойств. В течение аналогичного периода времени экстракты были стабильны и по концентрации антирадикальных антиоксидантов при хранении в холодильнике при температуре 4 ℃.

Список литературы / References:

1. *Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание*, том 1, Москва, 2015, ОФС.1.2.1.1.0003.15 [*State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition*, vol. 1, Moscow, 2015, OFS. 1.2.1.1.0003.15 (In Russ.)]

2. Куркина А.В. *Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды*. Автореф. дисс. … д-ра фармацевтических наук. Самара, 2013, 48 с. [Kurkina A.V. *Experimental-theoretical substantiation of approaches to standardization of raw materials and preparations of pharmacopoeial plants containing flavonoids*. The dissertation author's abstract on the competition of a scientific degree of Doctor of Pharmaceutical Sciences. Samara, 2013, 48 p. (In Russ.)]

3. Bondet W., Brand-Williams W., Berset C. *Lebensm.-Wiss u.-Technol.*, 1997, vol. 30, pp. 609-615.

4. Волков В.А., Сажина Н.Н., Пахомов П.М., Мисин В.М. *Химическая физика*, 2010, т. 29, № 8, с. 73-77. [Volkov V.A., Sazhina N.N., Pakhomov P.M., Misin V.M. *Chemical Physics*, 2010, vol. 29, no. 8, pp. 73-77. (In Russ.)]

5. Блажей А., Шутый Л. *Фенольные соединения растительного происхождения*. М.: Мир, 1977, 239 с. [Blazhey A., Shuty L. *Phenolic compounds of plant origin*. M.: Mir, 1977, 239 p. (In Russ.)]

6. *Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание*, том 3, ФС.2.5.0037.15 [*State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition*, vol. 3, FS.2.5.0037.15 (In Russ.)]

COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIRADICAL PROPERTIES AND OTHER PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF INDUSTRIAL SAMPLES OF WATER-PROPYLENE GLYCOL ETRACTS OF MEDICINAL PLANTS

Volkov V.A.[1], Li Yu.S.[2], Voronkov M.V.[3], Lapina G.P.[3], Zavyalov A.Yu.[1], Misin V.M.[1]

[1] Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences
Moscow, Russia
[2] Endocryne Enzyme Plant
Moscow, Russia
[3] Tver State University
Tver, Russia; e-mail: vl.volkov@mail.ru

Abstract. The physicochemical properties of water-propylene glycol plant extracts most popular in the cosmetic industry, the content of flavonoids and anti-radical antioxidants and their stability during storage, were studied. A correlation analysis of the results was carried out. The obtained data can be used for the development of production control methods.

Key words: *antioxidants, flavonoids, propylene glycol extracts, DPPH, ammetry.*

МОНОЛИТНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ ФЕНИЛКЕТОНУРИИ: РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ

Джужа А.Ю.[1], Волокитина М.В.[1, 2], Коржикова-Влах Е.Г.[1, 2], Тенникова Т.Б.[2]

[1] Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетский проспект, 26, Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ
[2] Институт высокомолекулярных соединений РАН
Большой пр. В.О., 31, г. Санкт-Петербург, 199004, РФ; e-mail: volokitinamariya@yandex.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Метод молекулярного импринтинга является широко используемым синтетическим подходом для изготовления новых функциональных полимерных материалов, характеризующихся высокой молекулярной селективностью. Этот метод основан на полимеризации функциональных мономеров в присутствии целевых молекул-шаблонов. Молекулярно-импринтированные полимеры применяются в широком спектре областей, таких как изготовление химических и биологических сенсоров, твердофазная экстракция, анализ лекарственных препаратов благодаря присущей им прочности, возможности многократного использования и воспроизводимости результатов. В настоящее время все больше исследований посвящено использованию в качестве сорбентов для процессов биосепарации макропористых монолитных материалов. Преимуществами данных материалов являются простота синтеза, высокая воспроизводимость, высокая механическая и химическая устойчивость и хорошо контролируемая поровая структура. Целью данной работы являлась разработка молекулярно-импринтированных систем на основе сополимера 2-аминоэтилметакрилата, 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата для экспресс-анализа фенилаланина в биологических жидкостях и исследования процесса молекулярного распознавания в этих системах. В рамках данной работы методом свободнорадикальной фотоинициируемой полимеризации получен ряд макропористых монолитных материалов в формате тонкого слоя. С использованием полученных МИП-систем разработана оптимальная процедура анализа фенилаланина. Изучено влияние таких факторов, как время взаимодействия МИП-системы с анализируемым объектом, размер пор материала матрицы и концентрация молекулы шаблона.
***Ключевые слова**: макропористые монолитные сорбенты, биочипы, молекулярно-импринтированные полимеры, фенилкетонурия.*

Молекулярно-импринтированные полимерные (МИП) материалы – полимерные системы, содержащие молекулярные отпечатки, сформированные в результате сополимеризации функционального и сшивающего мономеров в присутствии определенных молекул-шаблонов [1]. Принцип работы МИПов основывается на молекулярном распознавании целевой молекулы отпечатком, сформированном в процессе полимеризации и комплементарным целевой молекуле по размеру и форме, а также по расположению функциональных групп мономерных звеньев [2].

Синтез МИПов представляет собой универсальную процедуру, позволяющую, варьируя состав полимеризационной смеси, формат и способ полимеризации, получать селективные полимерные матрицы для детектирования широкого круга соединений. Одним из перспективных классов современных полимерных матриц для создания МИП-систем являются макропористые материалы монолитного типа. Данные материалы обладают рядом таких преимуществ, как стабильная и хорошо контролируемая на стадии получения поровая структура, высокая химическая и механическая стабильность, стабильность поровой структуры, и др. [3, 4].

Молекулярно-импринтированные полимеры получают в форме диспергированных частиц, планарных систем и монолитных колонок [5-8]. Однако, наибольший интерес представляет возможность получения высокоселективных МИПов в формате тонкого слоя, то есть биологического микрочипа. Использование подобных устройств позволит применять высокоселективные МИПы для определения различных диагностических маркеров при минимизации затрат времени и дорогостоящих реагентов для анализа.

Целью данной работы была разработка молекулярно-импринтированных систем на основе сополимера 2-аминоэтилметакрилата, 2-гидроксиэтилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата для экспресс-анализа уровня фенилаланина в биологических жидкостях и изучения особенностей молекулярного распознавания в данных системах.

Использование в качестве молекулы-шаблона фенилаланина обусловлено возможностью применения разрабатываемых тест-систем для диагностики фенилкетонурии (ФКУ). Данное заболевание является наследственным и в его основе лежит нарушение аминокислотного обмена [9]. В связи с высокой распространенностью в популяции, тяжестью поражения нервной системы и возможностью профилактики инвалидизирующих последствий, ФКУ является одной из первых наследственных болезней обмена, рекомендованных ВОЗ для ранней диагностики у новорожденных путем неонатального скрининга [10]. Критерием диагностики ФКУ, как правило, является уровень фенилаланина в сыворотке крови.

В ходе исследования был осуществлен синтез серии макропористых монолитных НИП и МИП материалов с использованием различного состава смеси порообразующих растворителей методом свободно-радикальной фотоинициируемой полимеризации и изучение поровой структуры полученных материалов методами сканирующей электронной микроскопии и эталонной порометрии.

Структура и свойства макропористого материала могут в большой степени влиять на процесс молекулярного распознавания. Поэтому правильный выбор полимеризационной системы и условий реакции имеет существенное значение при получении наиболее эффективных систем, основанных на молекулярном распознавании. Ключевыми характеристиками макропористых монолитных материалов является средний размер пор, пористость и удельная площадь поверхности [11]. По этой причине одной из задач данной работы являлось получение серии макропористых материалов в формате тонкого слоя с различным средним размером пор и изучение их эффективности в процессе молекулярного распознавания. Помимо поровых характеристик важным фактором, обуславливающим эффективность молекулярного распознавания, является правильный выбор мономеров в полимеризационной системе, которые могут придавать матрице необходимые гидрофильно-гидрофобные свойства, а также создавать благоприятное окружение для импринтируемой молекулы.

Для синтеза полимерных макропористых монолитных материалов были выбраны следующие момномеры: 2-аминоэтилметакрилат (АЭМА), 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА) и этиленгликольдиметакрилат (ЭДМА) в объемных соотношениях 10:30:60 %. В качестве молекулы-шаблона для получения систем молекулярного распознавания (молекулярно-импринтированных макропористых монолитных слоёв) использовали Boc-замещенный L-фенилаланин. Для инициирования свободнорадикальной реакции полимеризации был использован фотоинициатор 2-гидрокси-2-метилпропиофенон. Использованием различных комбинаций объемных соотношений растворителей достигали получения материалов с различным средним размеров пор. Так как толуол является несольватирующим растворителем для получаемых сополимеров, при использовании его в качестве порообразующего агента получали материалы с большим средним размером пор. Увеличение доли додеканола в полимеризационной смеси, напротив, позволяло получать поры с меньшим размером (табл. 1).

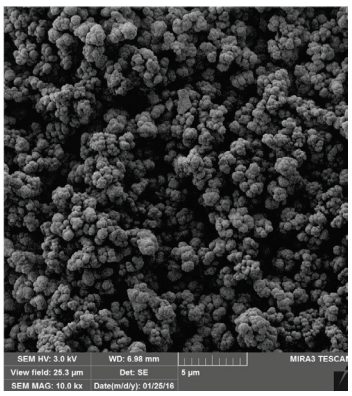
Методом сканирующей электронной микроскопии была показана однородность структуры и морфологии поверхности синтезированных материалов (рис. 1). На представленных микрофотографиях отчетливо видна микроглобулярная структура полученных полимеров. Размер микроглобул варьировался в зависимости от используемой системы порогенов. Так, увеличение содержания толуола в реакционной смеси приводило к увеличению размера полимерных микроглобул и, как следствие, образованию пор большего размера.

Для оценки эффективности и селективности связывания фенилаланина использовали метод флуоресцентного анализа. Для этого предварительно меченый флуоресцентной меткой FITC фенилаланин наносили на поверхность материала с помощью бесконтактного наноспоттера GesimNano-Plotter NP (Германия). После нанесения слои помещали во влажную среду и термостатировали в закрытом виде в темноте при температуре 37 °C. После завершения процесса аффинного связывания биочипы промывали смесью изопропанола с водой при использовании термошейкера и осуществляли детектирование на флуоресцентном сканере для микрочипов при длине волны лазера 532 нм.

Эффективность связывания аналита оценивали по величине относительной интенсивности сигнала, то есть по разности интенсивностей сигнала в анализируемой зоне и свечения фона (сигнал-шум). Для сравнения были проведены различные варианты связывания фенилаланина с использованием молекулярно-импринтированных и неимпринтированных систем. На рисунке 2 представлены изображения поверхности монолитных МИП и НИП-слоёв после проведения анализа.

Таблица 1. Поровые характеристики полученных макропористых монолитных материалов на основе сополимера ГЭМА-АЭМА-ЭДМА

№	Поровые характеристики		Порогены (%об:%об)	Примечания
	Размер пор, нм	Пористость, %		
1	1200	65	D:T = 20:80	
2	1100	60	D:T = 20:80	+BocPhe (4%)
3	980	60	D:T = 20:80	+BocPhe (6%)
4	960	65	D:T = 40:60	
5	720	60	D:T = 40:60	+BocPhe (4%)
6	650	60	D:T = 40:60	+BocPhe (6%)
7	680	65	D:T = 60:40	
8	470	65	D:T = 60:40	+BocPhe (4%)
9	380	60	D:T = 60:40	+BocPhe (6%)
10	340	65	D:T = 60:40	+BocPhe (8%)
11	390	65	D:T = 80:20	

А: 

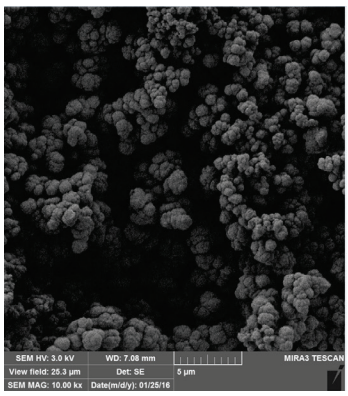
Б: 

Рисунок 1. Микрофотографии образцов макропористых монолитных материалов (СЭМ анализ) на основе сополимера ГЭМА-АЭМА-ЭДМА (НИП), полученных с использованием различного содержания порообразующих растворителей: *А* – додеканол:толуол – 60:40 (об%/об%); *Б* – додекалон:толуол – 20:80 (об%/об%)

Промывка системы после взаимодействия с аналитом является важным этапом анализа и производится для удаления несвязавшегося и неспецифически связавшегося аналита с поверхности и из внутреннего порового пространства материала. При этом важно, чтобы при качественном удалении неспецифически связавшихся молекул, основная их часть оставалась в искусственных сайтах связывания молекулярно-импринтированных систем. Так как фенилаланин хорошо растворим в изопропиловом спирте, для изучения влияния состава промывочной смеси были выбраны растворы с различными объемными соотношениями воды и изопропилового спирта. Гистограммы, иллюстрирующие результаты данного эксперимента представлены на рисунке 3. По полученным данным можно судить о том, что соотношение сигнал-шум начинает существенно падать при доле изопропилового спирта в промывочном растворе более 50%, что говорит о дальнейшем вымывании не только несвязавшегося фенилалнина, но и закрепившегося на сайтах связывания. Таким образом, оптимальной смесью для промывки был выбран раствор изопропанол - вода в соотношении 50-50.

Изучение влияния среднего размера пор макропористых монолитных слоёв на процесс молекулярного распознавания было проведено с использованием серии материалов со средним размером пор, близким к 400, 800 и 1200 нм. Гистограммы, иллюстрирующие зависимость относительной интенсивности сигнала от среднего размера пор для различных концентраций наносимого аналита, представлены на рисунке 4. Очевидно, что при проведении анализа в течение 3 часов размер пор материала не оказывал существенного влияния на эффективность связывания аналита с искусственными сайтами молекулярного распознавания. Данный результат возможно объяснить способностью аналита максимально связываться с молекулярно-импринтированной матрицей за данный промежуток времени, в связи с чем эффект размера пор нивелируется. Кроме того, из полученных данных видно, что при увеличении концентрации наносимого раствора аналита относительная интенсивность сигнала возрастает до максимального значения, достигаемого при концентрации порядка 50 000 нг/мл. При этом минимальная рабочая концентрация аналита для фенилаланина, меченого FITC составляла 10 000 нг/мл.

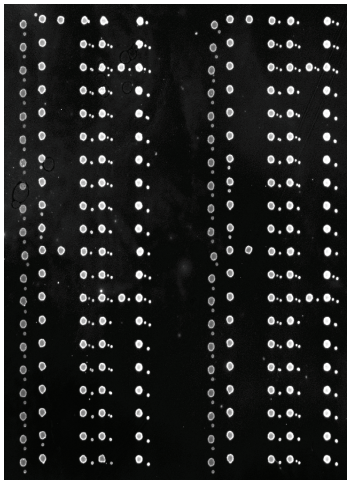


Рисунок 2. Поверхность биочипа после проведения анализа

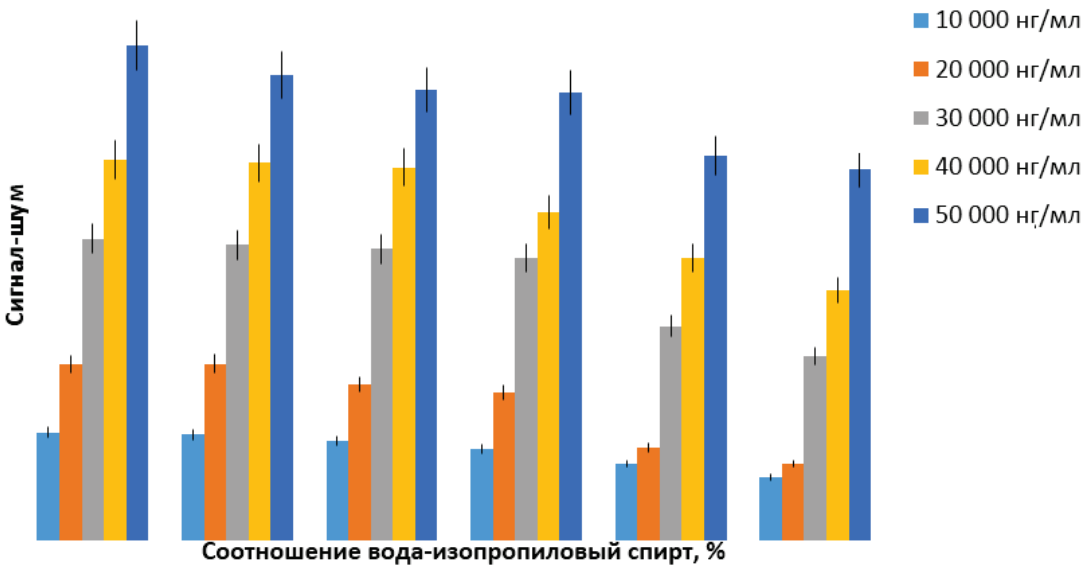


Рисунок 3. Влияние состава промывочной смеси на интенсивность сигнала, детектируемого с использованием МИП-системы (4%-BocPhe). Условия проведения анализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия с аналитом – 2 часа, температура – 37 °C.

Изучение влияния времени взаимодействия было проведено с использованием материалов со средним размером пор близким к 400 нм. Для этого после раскапывания растворов аналита на поверхность биочипы оставляли термостатироваться при температуре 37 °C на 0.5, 1, 2, 3, 5 и 24 ч. После чего следовала процедура промывки и детектирования. Гистограммы, показывающие зависимость относительной интенсивности сигнала от концентрации аналита и времени взаимодействия, представлены на рисунке 5. Очевидно, что относительная интенсивность сигнала устанавливается в своем максимальном значении по прошествии трех часов взаимодействия. Дальнейшее увеличение времени взаимодействия не влияет на значение сигнала, что говорит о достижении максимального количества связываний анализируемого вещества с сайтами МИП-матриц по истечении 3-х часов взаимодействия для систем с различным содержанием молекулы-шаблона.

Изучение влияния количества молекулы-шаблона в полимеризационной смеси на эффективность анализа фенилаланина было проведено на материалах со средним размером пор близким к 400 нм. Для исследования были взяты смеси с мольным содержанием фенилаланина 4, 6, 8% от общего количества мономеров, а также смеси без содержания молекулы-шаблона. Из представленных на рисунке 6 гистограмм можно наблюдать

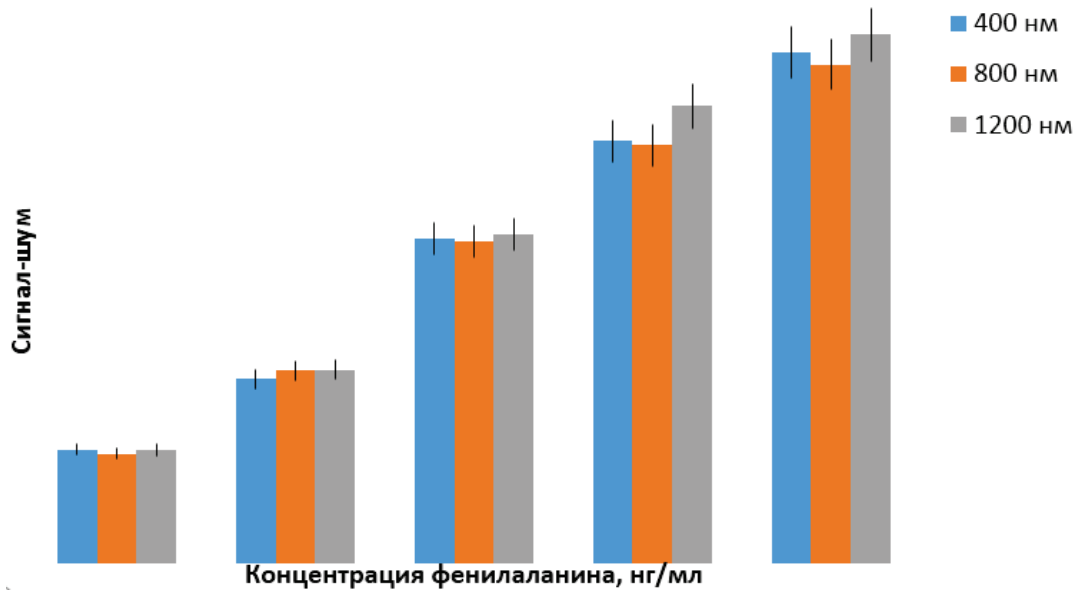


Рисунок 4. Влияние среднего размера пор на интенсивность сигнала, детектируемого при использовании МИП-системы (6%-BocPhe). Условия проведения биоанализа: время взаимодействия – 3 часа, температура – 37 °C.

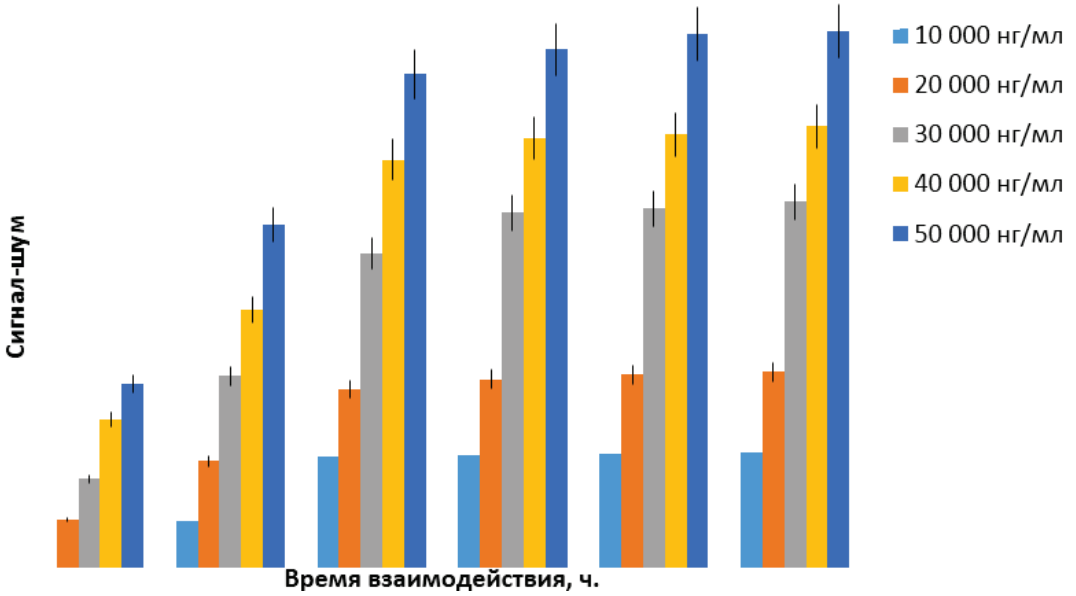


Рисунок 5. Влияние времени взаимодействия аналита с МИП-системой (6%-BocPhe) на относительную интенсивность детектируемого сигнала. Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, температура 37˚С

небольшое увеличение соотношения сигнал-шум для обеих систем при переходе от 4 %- к 8 %-содержанию фенилаланина в полимеризационной смеси, что говорит о практически идентичной эффективности использования молекулярно-импринтированных систем с различным содержанием молекулы-шаблона при детектировании фенилаланина в выбранных оптимальных условиях.

Для полученных МИП-систем с различным содержанием молекулы-шаблона были рассчитаны значения коэффициента импринтирования (*IF*) при концентрации аналита 50 000 нг/мл. Значения *IF* составили 1.7; 1.8 и 1.9 для МИП-систем, полученных при использовании 4 %; 6 % и 8 %-го содержания шаблона в полимеризационной смеси, соответственно. Показано, что эффективность молекулярного импринтинга немного возрастает при переходе от 4 % к 8 %-содержанию фенилаланина в полимеризационной смеси.

Таким образом, изучено влияние состава промывочной смеси, времени взаимодействия, среднего размера пор и количества молекулы-шаблона на эффективность анализа с использованием разработанных МИП-систем. Установлено, что при проведении взаимодействия в течение 3 часов, достигается максимальное связывание аналита с материалом МИП матрицы вне зависимости от его поровых характеристик и содержания молекулы-шаблона. Оптимальной системой для промывки МИП матриц была выбрана смесь вода-изопропиловый спирт в объёмном соотношении 50-50%. По результатам расчета импринтинг-факторов показана высокая эффективность

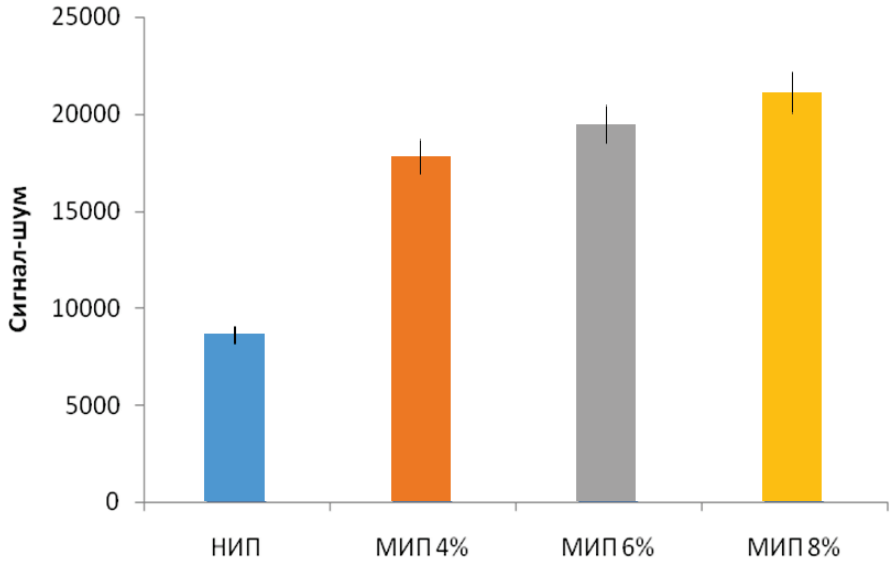


Рисунок 6. Влияние количества шаблона на относительную интенсивность сигнала при проведении детектирования фенилаланина с использованием различных МИП-систем. Условия проведения биоанализа: средний размер пор материала – 400 нм, время взаимодействия – 3 часа, температура – 37 °С.

использования разработанных молекулярно-импринтированых систем для детектирования низкомолекулярных метаболитов на примере анализа фенилаланина.

При выполнении работы было использовано оборудование ресурсных центров СПбГУ «Термогравиметрические и колориметрические методы исследования» для проведения анализа поровых характеристик получаемых материалов методом эталонной порометрии и «Геомодель» для исследования материалов методом сканирующей электронной микроскопии. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ №14-50-00069 (направление 05-109).

Список литературы / References:

1. Тарантул В.З. *Толковый словарь по молекулярной и клеточной биотехнологии. Т. 1. – М.: Языки славянской культуры*, 2015, 984 с. [Tarantula V.Z. *Explanatory dictionary of molecular and cellular biotechnology*. Vol. 1. – M.: languages of Slavic culture, 2015, 984 p. (In Russ.)]

2. Лисичкин Г.В., Крутяков Ю.А. *Успехи химии*, 2006, т. 75, с. 998-1017 [Lisichkin G.V., Krutyakov Yu.A. *Chemistry Successes*, 2006, vol. 75, pp. 998-1017 (In Russ.)].

3. Svec F., Tennikova T., Deyl Z. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, Elsevier. 2003.

4. Tennikova T.B., Belenkii B.G, Svec F. High-performance membrane chromatography. A novel method of protein separation. *J. Liq. Chromatogr.*, 1990, vol. 13 (1), pp. 63-70.

5. Kryscio D., Peppas N. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *ActaBiomater*., 2012, vol. 8 (2), p. 461.

6. Vlakh E.G., Stepanova M.A., Korneeva Yu.M., Tennikova T.B. Molecularly imprinted macroporous monoliths for solid-phase extraction: Effect of pore size and column length on recognition properties. *J. Chromatogr. B*, 2016, pp. 198-204.

7. Ashleya J., Shahbazia M.-A., Kanta K., Chidambarab V.A., Wolffa A., Dang Duong Bangb, Suna Yi. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, vol. 91, pp. 606-615.

8. Zhao Cheng-Jun, Ma Xiong-Hui, Li Jian-Ping. An Insulin Molecularly Imprinted Electrochemical Sensor Based on Epitope Imprinting. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, vol. 45, pp. 1360-1366.

9. Sahai I., Marsden D. Newborn screening. *Clin. Lab. Sci*., 2009, vol. 46 (2), pp. 55-82.

10. *Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению фенилкетонурии*. М., 2013. [*Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of phenylketonuria*. Moskow, 2013 (In Russ.)]

11. Vlakh E.G., Tennikova T.B. Preparation of methacrylate monoliths. *J. Sep. Sci.*, 2007, vol. 30, pp. 2801-2813.

MONOLITHIC MOLECULARLY IMPRINTED SYSTEMS FOR THE DETECTION OF PHENYLKETONURIA: DEVELOPMENT AND STUDY OF THE PROPERTIES

Dzhuzha A.U.[1], Volokitina M.V.[1, 2], Korzhikova-Vlakh E.G. [1, 2], Tennikova T.B.[2]

[1] Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University

Universitetskii pr, 26, Peterhof, St. Petersburg, 198504, Russia

[2] Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences

Bolshoi pr. V.O., 31, St. Petersburg, 199004, Russia; e-mail: volokitinamariya@yandex.ru

Abstract. A method of molecular imprinting is a widely used synthetic approach for the fabrication of novel functional polymers with pre-designed molecular selectivity. This method is based on the polymerization of functional monomers in presence of specially introduced target template molecules. Molecularly imprinted polymer materials are applied in a wide range of areas such as chemical and biological sensors, solid phase extraction and drug assays owing to their inherent robustness, reusability and reproducibility. Nowadays, more and more studies are devoted to macroporous monolithic materials as the modern design of sorbents intended to the bioseparation processes. Among the advantages of this kind of materials are the simplicity of synthesis, high reproducibility, high mechanical and chemical stability and well-controlled porous structure. The aim of this work was the development of molecularly imprinted systems based on the copolymer of 2-aminoethyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate and ethyleneglycol dimethacrylate for express-analysis of phenylalanine in biological liquids and study of the process of molecular recognition in these systems. In the frame of this work, a series of macroporous monolithic materials in the thin-layer form was obtained by the method of the free radical photo-initiative polymerization. Using obtained MIP systems, the optimal procedure for analyzing of phenylalanine was developed. The influence of such factors as the time of affinity interaction, the pore size of the material, the concentration of the template molecule were studied.

Key words: *macroporous monolithic sorbents, biochips, molecular imprinted polymers, phenylketonuria.*

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ СОСТОЯНИЙ КАРБОКСИАНГИДРАЗЫ

Катина Н.С.[1], Балобанов В.А.[1], Ильина Н.Б.[1], Маркелова Н.Ю.[2], Кашпаров И.А.[1], Марченков В.В.[1]

[1] Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ

[2] Институт биофизики клетки РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: delfinium27@rambler.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Карбоксиангидраза представляет собой однодоменный глобулярный белок, в нативном состоянии которого преобладает β-структура. В данной работе проведено исследование равновесного разворачивания апоформы карбоксиангидразы понижением pH. Показано, что денатурация белка кислым pH представляет собой переход между тремя состояниями $N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$. Добавление мочевины к I_2 приводит к его разворачиванию до развернутого состояния $I_2 \rightarrow U$. С помощью аппроксимации переходов равновесного разворачивания белка понижением pH и мочевиной удалось провести оценку стабильностей нативного и двух промежуточных состояний карбоксиангидразы. Описанный подход может быть использован в дальнейшем для исследования влияния аминокислотных замен на сворачивание данного белка. Также в работе были исследованы структурные особенности конформационных состояний карбоксиангидразы, полученные результаты позволили сделать вывод, что состояние I_1 находится в составе ассоциатов и содержит ненативные α-спиральные участки.

Ключевые слова: *карбоксиангидраза, сворачивание белка, промежуточное состояние, равновесное разворачивание, круговой дихроизм.*

ВВЕДЕНИЕ

Сразу после синтеза на рибосоме полипептидная цепь сворачивается в нативное состояние, в котором белок выполняет свою функцию [1]. В последние десятилетия были сделаны ключевые открытия в области исследования процесса сворачивания белков, которые позволили выявить основные закономерности самоорганизации полипептидной цепи [2-5]. Показано, что сворачивание большинства белков происходит с формированием одного ли нескольких промежуточных состояний [6, 7]. Промежуточные состояния белка представляют собой компактные стабильные состояния белковой молекулы, которые накапливаются в процессе сворачивания [7,8]. Позже было показано, что промежуточные состояния белков в большинстве случаев являются предшественниками амилоидов, образование которых в организме человека связано с развитием ряда тяжелых неизлечимых заболеваний [9, 10]. В связи с этим, исследование структуры промежуточных состояний белков и выяснение взаимосвязи процессов сворачивания и агрегации представляют собой важные направления современных исследований молекулярной биологии и биофизики.

Первым подробно охарактеризованным промежуточным состоянием было состояние расплавленной глобулы (MG) [11, 12]. Для него характерно наличие большей части нативной вторичной структуры при отсутствии плотной упаковки боковых групп [13, 14]. Позднее было показано, что сворачивание некоторых белков проходит через формирование нескольких промежуточных состояний, и был охарактеризован новый тип промежуточного состояния - предрасплавленная глобула (PMG), которое формируется на ранних стадиях сворачивания [13, 15, 16]. Таким образом, на первых стадиях сворачивания образуются элементы вторичной структуры, которые флуктуируют (PMG), затем эти элементы формируют компактное состояние с нативоподобной вторичной структурой (MG), на последней стадии сворачивания образуется уникальная нативная структура с плотной упаковкой боковых групп (N) [17].

Важным является вопрос о роли промежуточных состояний в процессе сворачивания белков. Показано, что наличие промежуточного состояния может привести к ускорению сворачивания белка благодаря тому, что фиксация частично свернутого состояния облегчает для полипептидной цепи поиск нативной конформации [18]. Оказалось, что помимо нативных контактов, в структуре промежуточных состояний может присутствовать доля ненативных взаимодействий. Например, при сворачивании некоторых β-белков в промежуточном состоянии образуются α-спирали, которые позднее трансформируются в β-структуру [19, 20]. Причем наличие ненативных взаимодействий в структуре промежуточных состояний приводит к ускорению процесса сворачивания [21, 22]. Эти результаты говорят о том, что сворачивание белка – это не просто постепенное увеличение количества контактов, а образование ненативных взаимодействий также важно для приобретения белком нативной конформации.

К настоящему времени сворачивание белков с накоплением одного промежуточного состояния достаточно подробно описано [23, 24]. Однако сворачивание многостадийных белков остается недостаточно изученным, а исследованию их агрегации посвящены лишь единичные работы [25, 26].

Целью данной работы было исследование структурных характеристик и стабильности конформационных

состояний многостадийно сворачивающегося белка на примере карбоксиангидразы. Карбоксиангидраза представляет собой фермент, содержащий цинк в качестве кофактора. Белок катализирует обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода. Карбоксиангидраза – однодоменный белок с молекулярной массой 29 кДа [27]. Вторичная структура представлена двумя β-шпильками, αβ-шпилькой и β-листом [28].

Карбоксиангидраза длительное время является классической моделью для исследования сворачивания многостадийных белков. Исследования равновесного разворачивания карбоксиангидразы показали, что сворачивание этого белка происходит с формированием как минимум двух промежуточных состояний [29-32]. По результатам кинетических экспериментов рассчитаны величины свободной энергии конформационных состояний белка, а также высота энергетических барьеров между ними [33, 34]. В последние годы также были начаты исследования амилоидообразования карбоксиангидразы. Для исследований агрегации используют апоформу карбоксиангидразы, то есть белок, не содержащий ионы цинка [25, 26]. В связи с тем, что цинк стабилизирует белок и способствует рефолдингу, то исследования агрегации удобно проводить в отсутствии ионов металлов [35]. Однако к настоящему времени в литературе отсутствуют исследования особенностей сворачивания апоформы карбоксиангидразы и структуры ее промежуточных состояний.

В данной работе проведено исследование равновесного разворачивания апоформы карбоксиангидразы понижением pH. Показано, что денатурация белка кислым pH представляет собой переход между тремя состояниями $N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$, при этом наблюдается практически полное накопление каждого конформационного состояния. Добавление мочевины к состоянию I_2 приводит к разворачиванию белка. С помощью аппроксимации переходов равновесного разворачивания белка понижением pH и мочевиной была проведена оценка стабильности нативного и двух промежуточных состояний карбоксиангидразы. Структурные характеристики промежуточных состояний были исследованы методами кругового дихроизма (КД) в дальней и ближней ультрафиолетовой (УФ) области, а также методом динамического рассеяния света, степень экспонированности гидрофобных групп на растворитель была оценена по интенсивности флуоресценции ANC. Полученные результаты свидетельствуют о том, что состояние I_1 присутствует в составе ассоциатов и содержит ненативные α-спиральные участки. Вероятно, на последней стадии сворачивания белка часть α-спиралей промежуточного состояния подвергается конформационным перестройкам и участвует в формировании β-структуры нативного состояния. Таким образом, полученные данные позволили получить новую информацию о сворачивании апоформы карбоксиангидразы, а также о структурных особенностях и стабильности промежуточных состояний белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспрессия и очистка белка.

Плазмида pET-11c_joe, содержащая ген бычьей карбоксиангидразы II, была экспрессирована в клетках *E.coli* (штамм BL21 Star DE3) при температуре 37°C. Разрушение клеточных стенок проводили с использованием ультразвукового дезинтегратора Digital sonifier (Branson, США) в течение 5 минут в буфере 20 мМ этаноламин pH 9,2, содержащем 0,5 М PMSF, 20 мМ β-меркаптоэтанол и 1 мМ ЭДТА для ингибирования протеаз. Полученный раствор центрифугировали со скоростью 30000 об/мин в течение 30 минут. Для осаждения нуклеиновых кислот к полученному супернатанту добавляли стрептомицин до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали 30 минут при перемешивании. Затем раствор центрифугировали со скоростью 30000 об/мин в течение 30 минут.

Очистку белка проводили при помощи ионообменной хроматографии на колонке monoQ Hitrap с использованием системы AKTA (Fisher Scientific, США). Колонку уравновешивали буфером 20 мМ этаноламин pH 9,2, перед нанесением на колонку препарат карбоксиангидразы переводили в данный буфер посредством диализа. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1 М. Затем для получения апоформы карбоксиангидразы в белок добавляли мочевину до конечной концентрации 6 М и ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ. Раствор инкубировали 2 часа при комнатной температуре, белок ренатурировали градиентным диализом в буфер 50 мМ трис-HCl pH 8, содержащий 500 мМ NaCl. Затем в данном буфере проводили гель-хроматографию на носителе Sephacril S-200 с использованием системы HPLC ProStar (Varian, США). Чистоту белка на каждой стадии очистки контролировали с помощью электрофореза в 15 % полиакриламидном геле в присутствии SDS [36]. Фракции, содержащие карбоксиангидразу, диализовали в 5 мМ бикарбонат аммония pH 8, и лиофильно высушивали с использованием лиофилизатора VirTis K5 (SP Scientific, США).

Подготовка образцов для исследования равновесного разворачивания.

Для исследования равновесного разворачивания карбоксиангидразы кислым pH готовили раствор белка с концентрацией 1 мг/мл в 50 мМ фосфат-цитратном буфере pH 5,6. Затем аликвоты этого раствора в объемном соотношении 1/10 добавляли в буферные растворы в диапазоне pH от 5,6 до 2 (значения pH ниже 2,6 достигали добавлением в буфер соответствующего количества HCl). Значения pH полученных образцов измеряли с использованием pH-метра FiveEasy (Mettler Toledo, США). Перед измерениями образцы инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре.

Для исследования равновесного разворачивания карбоксиангидразы мочевиной готовили раствор белка с концентрацией 1 мг/мл в буфере 50 мМ глицин-HCl pH 2,4. Затем аликвоты этого раствора в объемном соотношении 1/10 добавляли в буферные растворы с концентрацией мочевины в диапазоне 0-6 М. Перед измерениями образцы инкубировали в течение 24 часов при комнатной температуре.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм. Коэффициент экстинкции равный 1,72 был рассчитан теоретически [37].

Круговой дихроизм.

Измерение спектров КД проводили на спектрополяриметре Chirascan (Photophysics, Англия). Для измерений спектров в дальней УФ области использовали кювету с длиной оптического пути 1 мм, концентрация белка составляла 0,1 мг/мл. Для измерений спектров в ближней УФ области использовали кювету с длиной оптического пути 0,1 мм, концентрация белка составляла 1 мг/мл. Все измерения проводили при температуре 25°C.

Молярная эллиптичность $[\Theta]$ вычислялась по формуле: $[\Theta] = \frac{\Theta_\lambda \times MRW}{l \times C}$, где Θ_λ – измеряемая величина эллиптичности на длине волны λ (мград); *MRW* – средний молекулярный вес остатка, вычисленный из аминокислотной последовательности; l – длина оптического пути (мм); C – концентрация белка (мг/мл).

Флуоресценция.

Измерение спектров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) с использованием кюветы с оптическим путем 3×3 мм при температуре 25 °C. Для измерения спектров триптофановой флуоресценции концентрация белка была равна 0,1 мг/мл. Длина волны возбуждения составляла 293 нм, спектр регистрировали в диапазоне 300-450 нм.

Для измерения спектров флуоресценции АНС концентрация белка была равна 0,1 мг/мл (3,5 мкМ), молярное соотношение белок/краситель составляло ¼. Длина волны возбуждения составляла 360 нм, спектр регистрировали в диапазоне 400-600 нм.

Динамическое рассеяние света.

Измерение динамического рассеяния света было проведено с использованием прибора Zetasizer nano ZSP (Malvern, Великобритания) при температуре 25 °C. Перед измерениями образцы центрифугировали 30 минут со скоростью 90000 об/мин на ультрацентрифуге Beckman 100 (Beckman Coulter, США). При расчете гидродинамического радиуса для образца, растворенного в 6М мочевины, использовали значение вязкости раствора, рассчитанное по формуле из работы [38].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование равновесного разворачивания карбоксиангидразы.

Переходы равновесного разворачивания. В большинстве случаев при денатурации белков в растворе присутствует смесь молекул в различных конформационных состояниях, что затрудняет исследование структурных особенностей и стабильности промежуточных состояний белков. В связи с этим для подробного исследования промежуточных состояний важно подобрать такой тип денатурации, при котором наблюдается 100%-ное накопление каждого состояния. Для бычьей карбоксиангидразы показано, что при ее разворачивании мочевиной и гуанидингидрохлоридом не наблюдается полного накопления промежуточных состояний [15, 33]. В связи с этим в данной работе было исследовано равновесное разворачивание кислым pH, которое представляет собой менее жесткий тип денатурации.

Структурные изменения при денатурации карбоксиангидразы регистрировали методами триптофановой флуоресценциии и КД в дальней УФ области. На рисунке 1 представлены переходы равновесного разворачивания белка понижением pH, построенные по изменению отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 320/380 нм, а также молярной эллиптичности на длине волны 215 нм, так как минимум в данной области характерен для спектров β-структурных белков. По рисункам видно, что разворачивание карбоксиангидразы кислым pH представляет собой переход между тремя состояниями. При pH 5,6-4,8 белок находится в нативном состоянии N, при pH 3,9-4,3 наблюдается накопление промежуточного состояния I_1, при pH 2-2,6 белок находится в состоянии I_2. Значение молярной эллиптичности состояния I_2 на длине волны 215 нм составляет $7 \cdot 10^{-3}$ град·см^2/дмоль, это свидетельствует о том, что данное состояние не является развернутым и сохраняет значительную часть вторичной структуры.

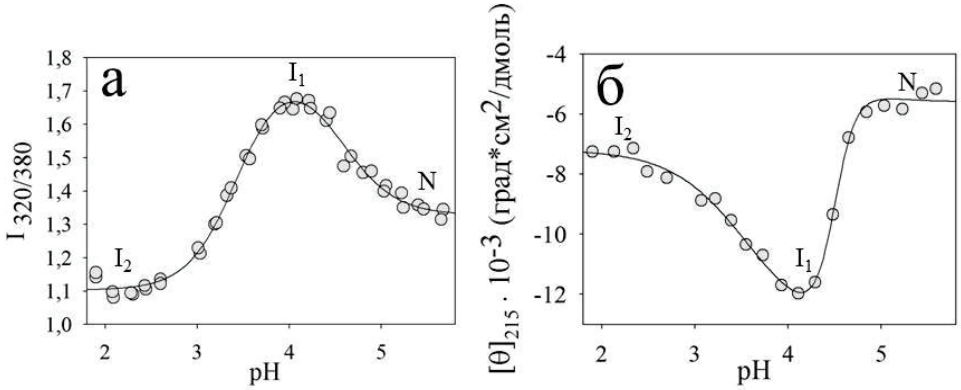


Рисунок 1. Переходы равновесного разворачивания карбоксиангидразы понижением pH, регистрируемые методом триптофановой флуоресценции (а) и КД в дальней УФ области (б)

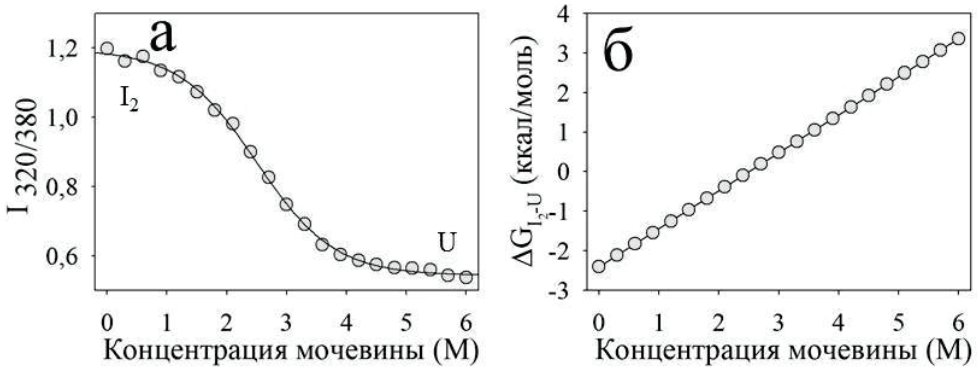


Рисунок 2. Переход равновесного разворачивания карбоксиангидразы мочевиной при pH 2,4, регистрируемый методом триптофановой флуоресценции (а); зависимость свободной энергии состояния I_2 относительно развернутого состояния от концентрации мочевины (б)

Для оценки стабильности состояния I_2 было проведено его равновесное разворачивание мочевиной при pH 2,4, полученный переход, построенный по изменению отношения интенсивностей флуоресценции на длинах волн 320/380 нм, представлен на рисунке 2а.

Оценка стабильности конформационных состояний карбоксиангидразы. В качестве меры стабильности конформационных состояний белков обычно используют значение свободной энергии ΔG. Однако зависимость ΔG(pH) различна для каждого белка, и определяется значениями pK его заряженных аминокислотных остатков, в связи с этим достоверное построение данной зависимости является затруднительным [39, 40]. Поэтому в качестве меры стабильности конформационных состояний белков при денатурации понижением pH удобно использовать значения середин переходов. Значения середин переходов $C_{1/2}$ (ед. pH) для переходов N-I_1 и I_1-I_2 были получены из аппроксимации кривых равновесного разворачивания понижением pH функцией суммы двух сигмоид. Полученные значения для денатурационных кривых, регистрируемых методами триптофановой флуоресценции и КД, представлены в таблице 1.

В отличие от зависимости ΔG от pH, зависимость ΔG от концентрации мочевины является линейной, что позволяет достоверно рассчитать значение ΔG ($I_2 \rightarrow U$) по результатам равновесного разворачивания состояния I_2 мочевиной. Для расчета термодинамических параметров состояния I_2 кривая равновесного разворачивания карбоксиангидразы мочевиной при pH 2,4 была аппроксимирована по модели двух состояний [41, 42] с использованием следующих формул:

$$F = i_2 - f_u \times (i_2 - u)$$
$$fi_2 = 1 - f_u$$
$$f_u = \frac{k}{1+k}$$
$$k = \exp \frac{-(G_0 + m*x)}{RT},$$

где F – функция аппроксимации: fi_2 и fu – доли состояний I_2 и U, соответственно: i_2 и u – значение регистрируемого параметра (отношение интенсивностей флуоресценции $I_{320/380}$) состояний I_2 и U, соответственно: k – константа равновесия: G_0 – значение ΔG при концентрации мочевины равной 0 (ккал/моль): m – параметр, характеризующий корпоративности перехода между состояниями (ккал/моль/моль): x – концентрация мочевины (моль): R – газовая постоянная (ккал/моль/К); T – температура (К).

По результатам аппроксимации были получены значения m и G_0, исходя из которых, были рассчитаны значение середины перехода $C_{1/2}$ (моль) по формуле $C_{1/2} = \frac{-G_0}{m}$, а также значение свободной энергии состояния I_2 относительно развернутого состояния $\Delta G_{I2\text{-}U}$ (ккал/моль) по формуле $\Delta G_{I2\text{-}U} = G_0 + m \times x$. Полученные значения указаны в таблице 2. На рисунке 2б представлен график зависимости свободной энергии состояния I_2 относительно развернутого состояния от концентрации мочевины.

Таблица 1. Значения середин переходов N-I_1 и I_1-I_2 карбоксиангидразы, рассчитанные по результатам денатурации белка понижением pH. Погрешность рассчитана по результатам двух независимых измерений

Переход	$C_{1/2}$ **(ед. pH)**	
	Флуоресценция	**КД**
N-I_1	4,57 ± 0,01	4,51 ± 0,01
I_1-I_2	3,43 ± 0,01	3,60 ± 0,04

Таблица 2. Термодинамические параметры карбоксиангидразы, рассчитанные по результатам равновесного разворачивания белка мочевиной при pH 2,4. Погрешность рассчитана по результатам двух независимых измерений

Переход	$C_{1/2}$ (моль)	$\Delta G_{I2\text{-}U}$ (ккал/моль)	m (ккал/моль/моль)
I_2-U	2,50 ± 0,07	-2,40 ± 0,18	0,96 ± 0,05

Исследование структурных характеристик конформационных состояний карбоксиангидразы.

Данные равновесного разворачивания позволили определить условия, при которых наблюдается практически полное накопление четырех конформационных состояний карбоксиангидразы: pH 5,5 – состояние N, pH 4 – состояние I_1, pH 2,4 – состояние I_2, pH 2,4 и 6 М мочевины – состояние U. В данных условиях были исследованы вторичная и третичная структура, а также определены гидродинамический радиус и экспонированность гидрофобных групп на растворитель всех описанных состояний.

Третичная структура конформационных состояний карбоксиангидразы. Для определения наличия третичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы был использован метод КД в ближней УФ области. Данные спектры отражают асимметричность окружения ароматических боковых групп аминокислотных остатков, которая характерна для белка, содержащего третичную структуру. Каждый ароматический аминокислотных остаток характеризуется пиком в определенном диапазоне длин волн, соответственно на спектре присутствует несколько пиков, интенсивность которых зависит от плотности окружения боковых групп, их количества и других факторов [43]. На рисунке 3а представлены спектры КД в ближней УФ области нативного, промежуточных и развернутого состояний карбоксиангидразы. Спектр нативного состояния карбоксиангидразы свидетельствует о наличии в белке выраженной третичной структуры в данных условиях. Спектры состояний I_1 и I_2, близки к спектру развернутого состояния и свидетельствуют о том, что в промежуточных состояниях карбоксиангидразы третичная структура практически отсутствует.

Экспонированность гидрофобных групп на растворитель. Для характеристики экспонированности гидрофобных групп в белках используют флуоресцентный краситель АНС. АНС не связывается с гидрофобными группами, которые плотно упакованы в структуре нативного состояния, а также не взаимодействует с развернутым состоянием белков. Сродство АНС высоко к молекулам белка, содержащим значительную часть вторичной структуры, но без плотной упаковки боковых групп [44]. В данной работе исследовано связывание АНС с конформационными состояниями карбоксиангидразы (рис. 3б). Видно, что нативное и развернутое состояния белка не связывают краситель, тогда как промежуточные состояния связывают АНС, что проявляется в возрастании его флуоресценции. Кроме того, интенсивность флуоресценции несколько ниже для состояния I_2 по сравнению с I_1.

Оценка гидродинамического радиуса. Гидродинамический радиус конформационных состояний карбоксиангидразы был определен по данным динамического рассеяния света, полученные результаты представлены в таблице 3. Гидродинамический радиус нативного и развернутого состояний равен 23,5 Å и 50,3 Å, соответственно, что хорошо согласуется со значениями, полученными для данного белка ранее при исследовании его разворачивания гуанидингидрохлоридом [29]. Неожиданным оказалось значение гидродинамического радиуса состояния I_1, равное 123,5 Å, что существенно превышает значение для развернутого белка. Это свидетельствует о том, что состояние I_1 при pH 4 формирует ассоциаты.

Исследование вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы. Оценка содержания элементов вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы была проведена по данным КД в дальней УФ области (рис. 4). В связи с недостоверным измерением КД в области длин волн ниже 210 нм для растворов мочевины, на рисунке спектр развернутого состояния белка представлен в диапазоне 210-260 нм.

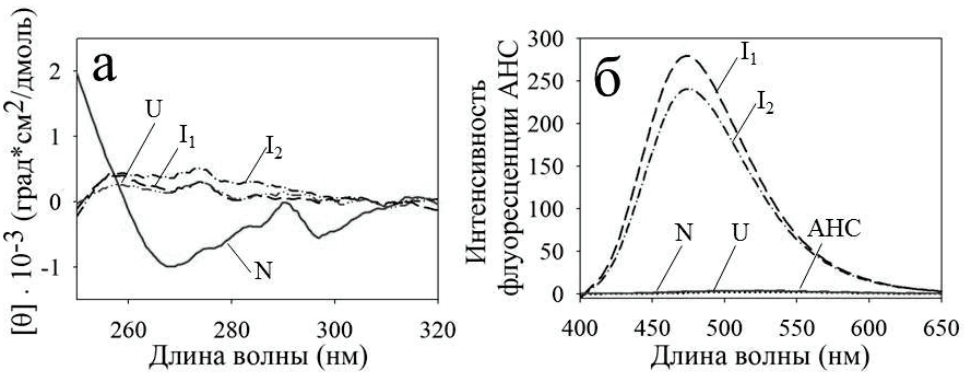


Рисунок 3. Характеристики конформационных состояний карбоксиангидразы: спектры КД в ближней УФ области (а), спектры флуоресценции АНС, в качестве контроля представлен спектр свободного красителя (б)

Таблица 3. Гидродинамический радиус (R_h) конформационных состояний карбоксиангидразы. Погрешность рассчитана по результатам трех измерений

Состояние	R_h, Å
N	23,5 ± 2,0
I_1	123,5 ± 18,0
I_2	62,0 ± 7,5
U	50,3 ± 0,7

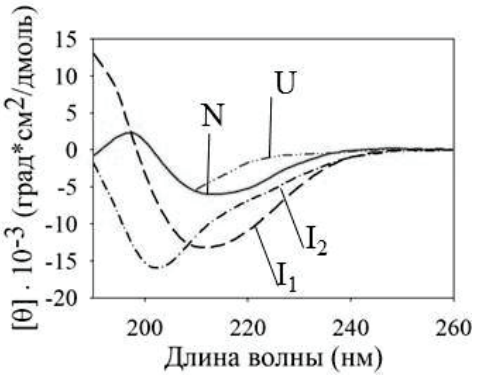


Рисунок 4. Спектры КД в дальней УФ области конформационных состояний карбоксиангидразы

Спектры КД нативного и промежуточных состояний белка были обсчитаны с помощью алгоритма K_2D, что позволило оценить процентное содержание элементов вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы (табл. 4) [45]. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что содержание α-спиралей в состоянии I_1 существенно выше по сравнению с нативным состоянием белка, это свидетельствует о наличии ненативной спиральной структуры в промежуточном состоянии карбоксиангидразы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам равновесного разворачивания апоформы карбоксиангидразы, проведенным в данной работе, были определены значения pH, при которых наблюдается практически полное накопление нативного (N) и двух промежуточных состояний белка (I_1 и I_2). Это позволило исследовать структурные особенности промежуточных состояний, а также оценить стабильность состояний N и I_1. Для исследования стабильности состояния I_2 было проведено его разворачивание мочевиной до развернутого состояния. Таким образом, совместное исследование равновесного разворачивания белка понижением pH и мочевиной позволило охарактеризовать структурные свойства и стабильность нативного и двух промежуточных состояний карбоксиангидразы, описанный подход может быть использован в дальнейшем для исследования влияния аминокислотных замен на сворачивание данного белка.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что состояние I_1 при pH 4 находится в составе ассоциатов и содержит ненативные α-спирали. Ассоциация промежуточных состояний была показана на примере ряда белков, и объясняется наличием в промежуточных состояниях значительного количества гидрофобных групп, экспонированных на растворитель, которые могут формировать межмолекулярные взаимодействия [9, 10]. Важный вопрос заключается в том, какой тип агрегатов образует данное промежуточное состояние в конкретных условиях. Литературные данные свидетельствуют о том, что при pH 2,4 апоформа карбоксиангидразы формирует амилоидные агрегаты, тогда как при pH 3,6 не наблюдается образования амилоидов и, при повышении температуры белок образует аморфные агрегаты [26]. Исходя из результатов данной работы, можно предположить, что высокая населенность при pH 3,6 состояния I_1, которое формирует α-спиральные ассоциаты, препятствует амилоидной агрегации карбоксиангидразы в данных условиях.

В процессе сворачивания белка происходит постепенное структурирование белковых молекул, поэтому, кажется очевидным, что в промежуточных состояниях формируются преимущественно нативные взаимодействия. Однако для ряда β-структурных белков показано, что при их сворачивании происходит

Таблица 4. Содержание элементов вторичной структуры конформационных состояний карбоксиангидразы, рассчитанное с помощью алгоритма K_2D

Состояние	**α-спирали, %**	**β-структура, %**	**Клубок, %**
N	12,1	30,4	57,5
I_1	68,6	1,1	22,4
I_2	26,0	16,4	57,6

образование промежуточных состояний с высоким содержанием ненативных α-спиралей, которые на последующих этапах сворачивания подвергаются конформационным перестройкам с формированием β-структуры [19, 20]. Значительное количество работ посвящено исследованию роли α-спиральных интермедиатов в процессе сворачивания β-структурных белков и возможных причин их формирования. Согласно гипотезе Лима любая аминокислотная последовательность, формирующая β-структуру, может в определенных условиях образовывать стабильную α-спираль [46, 47]. С помощью сервера CFSSP, исходя из аминокислотной последовательности карбоксиангидразы, были определены участки белка, способные формировать α-спирали [48]. Согласно полученным результатам, 63% последовательности карбоксиангидразы формирует стабильную α-спиральную структуру, что приблизительно совпадает с процентным содержанием спиралей в состоянии I_1, рассчитанным по результатам КД (табл. 4). Вероятно, β-структура в нативном состоянии карбоксиангидразы стабилизирована третичными взаимодействиями, разрушение которых при денатурации приводит к формированию α-спиралей, стабильность которых определяется первичной структурой белка.

Работа по экспрессии и очистке карбоксиангидразы поддержана грантом РФФИ № 18-34-00935, исследование стабильности белка поддержано грантом РНФ № 14-24-00157.

Список литературы / References:

1. Kolb V.A., Makeyev E.V., Spirin A.S. Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system. *EMBO J.,* 1994, vol. 13, pp. 3631-3637.

2. Dill K.A., MacCallum J.L. The protein-folding problem, 50 years on. *Science*, 2012, vol. 338, pp. 1042-1046.

3. Anfinsen C.B. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J.,* 1972, vol. 128, pp. 737-749.

4. Honig B. Protein folding: from the Levintal paradox to structure prediction. *J. Mol. Biol.,* 1999, vol. 293, pp. 283-293.

5. Privalov P.L., Khechinashvili N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol*., 1974, vol. 86, pp. 665-684.

6. Privalov P.L. Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.,* 1996, vol. 258, pp. 707-725.

7. Brockwell D.J., Radford S.E. Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, vol. 17, pp. 30-37.

8. Baldwin R.L., Rose G.D. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, vol. 24, pp. 26-33.

9. Calamai M., Chiti F., Dobson C.M. Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophys. J.,* 2005, vol. 89, pp. 4201-4210.

10. Apetri A.C., Surewicz K., Surewicz W.K. The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein. *J. Biol. Chem.,* 2004, vol. 279, pp. 18008-18014.

11. Dolgikh D.A., Gilmanshin R.I., Brazhnikov E.V., Bychkova V.E., Semisotnov G.V., Venyaminov S., Ptitsyn O.B. Alpha-lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Letters,* 1981, vol. 136, pp. 311-315.

12. Ptitsyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V., Zerovnik E., Razgulyaev O.I. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Letters,* 1990, vol. 262, pp. 20-24.

13. Naiyer A., Hassan M.I., Islam A., Sundd M., Ahmad F. Structural characterization of MG and pre-MG states of proteins by MD simulations, NMR, and other techniques. *J. Biomol. Struct. Dyn*., 2015, vol. 33, pp. 2267-2284.

14. Hughson F.M., Wright P.E., Baldwin R.L. Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science,* 1990, vol. 249, pp. 1544-1548.

15. Uversky V.N., Ptitsyn O.B. Further evidence on the equilibrium 'pre-molten globule state': Four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase b at low temperature. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 255, pp. 215-228.

16. Uversky V.N., Ptitsyn O.B. 'Partly folded' state, a new equilibrium state of protein molecules: Four-state guanidinium chloride-induced unfolding of beta-lactamase at low temperature. *Biochemistry,* 1994, vol. 33, pp. 2782-2791.

17. Uversky V.N., Goto Y. Acid denaturation and anion-induced folding of globular proteins: multitude of equilibrium partially folded intermediates. *Curr. Protein Pept. Let.*, 2009, vol. 10, pp. 447-455.

18. Neuweiler H., Doose S., Sauer M. A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, pp. 16650-16655.

19. Forge V., Hoshino M., Kuwata K., Arai M., Kuwajima K., Batt C.A., Goto Y. Is folding of beta-lactoglobulin non-hierarchic? Intermediate with native-like beta-sheet and non-native alpha-helix. *J. Mol. Biol.,* 2000, vol. 296, pp. 1039-1051.

20. Yang J.J., Yang H., Ye Y., Hopkins H.Jr., Hastings G. Temperature-induced formation of non-native intermediate state of the all beta-sheet protein CD2. *Cell Biochem. Biophys.*, 2002, vol. 36, pp. 1-18.

21. Sakurai K., Fujioka S., Konuma T., Yagi M., Goto Y. A circumventing role for the non-native intermediate in the folding of β-lactoglobulin. *Biochemistry,* 2011, vol. 50, pp. 6498-6507.

22. Friel C.T., Beddard G.S., Radford S.E. Switching two-state to three-state kinetics in the helical protein Im9 via the optimisation of stabilising non-native interactions by design. *J. Mol. Biol.,* 2004, vol. 342, pp. 261-273.

23. Uzawa T., Nishimura C., Akiyama S., Ishimori K., Takahashi S., Dyson H.J., Wright P.E. Hierarchical folding mechanism of apomyoglobin revealed by ultra-fast H/D exchange coupled with 2D NMR. *Proc. Natl. Acsd. Sci. USA*, 2008, vol. 105, pp. 13859-13864.

24. Maisuradze G.G., Zhou R., Liwo A., Xiao Y., Scheraga H.A. Effects of mutation, truncation, and temperature on the folding kinetics of WW domain. *J. Mol. Biol.*, 2012, vol. 420, pp. 350-365.

25. Es-Haghi A., Shariatizi S., Ebrahim-Habibi A., Nemat-Gorgani M. Amyloid fibrillation in native and chemically-modified forms of carbonic anhydrase II: role of surface hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1824, pp. 468-477.

26. Gard D.K., Kundu B. Clues for divergent, polymorphic amyloidogenesisi through dissection of amyloid forming steps of bovine carbonic anhydrase and its critical amyloid forming stretch. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2016, vol. 1864, pp. 794-804.

27. Krishnamurthy V.M., Kaufman G.K., Urbach A.R., Gitlin I., Gudiksen K.L., Weibel D.B., Whitesides G.M. Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, pp. 946-1051.

28. Saito R., Sato T., Ikai A., Tanaka N. Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 A resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 2004, vol. 60, pp. 792-795.

29. Uversky V.N., Ptitsyn O.B. Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinum chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 255, pp. 215-228.

30. Bushmarina N.A., Kuznetsova I.M., Biktashev A.G., Turoverov K.K., Uversky V.N. Partially folded conformations in the folding pathway of bovine carbonic anhydrase II: a fluorescence spectroscopic analysis. *Chembiochem*., 2001, vol. 2, pp. 813-821.

31. Ptitsyn O.B., Pain R.H., Semisotnov G.V., Zerovnik E., Razgulyaev O.I. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.*, 1990, vol. 262, pp. 20-24.

32. Dolgikh D.A., Kolomiets A.P., Bolotina I.A., Ptitsyn O.B. 'Molten-globule' state accumulates in carbonic anhydrase folding. *FEBS Lett.*, 1984, vol. 165, pp. 88-92.

33. Melnik B.S., Marchenkov V.V., Evdokimov S.R., Samatova E.N., Kotova N.V. Multy-state protein: determination of carbonic anhydrase free-energy landscape. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 2008, vol. 369, pp. 701-706.

34. McCoy L.F. Jr, Rowe E.S., Wong K.P. Multiparameter kinetic study on the unfolding and refolding of bovine carbonic anhydrase B. *Biochemistry*, 1980, vol. 19, pp. 4736-4743.

35. Andersson D., Hammarstrom P., Carlsson U. Cofactor-induced refolding: refolding of molten globule carbonic anhydrase induced by Zn(II) and Co(II). *Biochemistry*, 2001, vol. 40, pp. 2653-2661.

36. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680-685.

37. Gill S.C., von Hippel P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 1989, vol. 182, pp. 319-326.

38. Kawahara K., Tanford C. Viscosity and density of aqueous solutions of urea and guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.*, 1966, vol. 241, pp. 3228-3232.

39. Oliveberg M., Fersht A.R. Formation of electrostatic interactions on the protein-folding pathway. *Biochemistry*, 1996, vol. 35, pp. 2726-2737.

40. Jamin M., Geierstanger B., Baldwin R.L. The pKa of His-24 in the folding transition state of apomyoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, vol. 98, pp. 6127-6131.

41. Bolen D.W., Santoro M.M. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of delta G degrees N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, 1998, vol. 27, pp. 8069-8074.

42. Pace C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*., 1986, vol. 131, pp. 266-280.

43. Kelly S.M., Price N.C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.,* 2000, vol. 1, pp. 349-384.

44. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Razgulyaev O.I., Uversky V.N., Gripas' A.F., Gilmanshin R.I. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 1991, vol. 31, pp. 119-128.

45. Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J., Moran F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.*, *1993,* vol. 6, pp. 383-390.

46. Chen E., Everett M.L., Holzknecht Z.E., Holzknecht R.A., Lin S.S., Bowles D.E., Parker W. Short-lived alpha-helical intermediates in the folding of beta-sheet proteins. *Biochemistry*, 2010, vol. 49, pp. 5609-5619.

47. Lim V.I. Structural principles of the globular organization of protein chains. A stereochemical theory of globular protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, 1974, vol. 88, pp. 857-872.

48. Kumar T.A. CFSSP: Chou and Fasman secondary structure prediction server. *Wide Spectrum*, 2013, vol. 1, pp. 15-19.

STRUCTURAL FEATURES AND STABILITY OF CARBONIC ANHYDRASE INTERMEDIATE STATES

Katina N.S.[1], Balobanov V.A.[1], Ilyina N.B.[1], Markelova N.Y.[2], Kashparov I.A.[1], Marchenkov V.V.[1]

[1] Institute of Protein Research RAS

Institutskaya St., 4, Pushchino, 142290, Russia

[2] Institute of Cell Biophysics

Institutskaya St., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: delfinium27@rambler.ru

Abstract. Carbonic anhydrase is a globular single-domain protein; its native state is dominated by β-structure. In this work the study of pH-induced equilibrium unfolding of carbonic anhydrase apoform has been carried out. It was shown that the protein denaturation by low pH represents the tree-state transition $N \rightarrow I_1 \rightarrow I_2$. Addition of urea to I_2 leads to its unfolding to the unfolded state $I_2 \rightarrow U$. Using approximation of pH-induced and urea-induced equilibrium unfolding transition curves the estimation of the stability of carbonic anhydrase native and both intermediate states was carried out. Described approach can be used further for investigation of the influence of amino acid substitutions on the folding process of this protein. Moreover in this work the structural features of carbonic anhydrase conformational states were investigated, obtained results concluded that I_1 forms associates and contains nonnative α-helical regions.

Key words: *carbonic anhydrase, protein folding, intermediate state, equilibrium unfolding, circular dichroism.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РНК-ШАПЕРОНА PROQ ИЗ ESCHERICHIA COLI И ЕГО ДОМЕНОВ С МАЛОЙ РЕГУЛЯТОРНОЙ РНК rdlD

Леконцева Н.В., Фандо М.С., Михайлина А.О., Коробейникова А.В., Никулин А.Д.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Для поддержания стабильности и правильного функционирования мрРНК часто необходимы РНК-шапероны – РНК-связывающие белки, способные плавить вторичную структуру РНК. Недавние исследования показали, что белки, содержащие домен ProQ/FinO, можно выделить в новый класс РНК-шаперонов, которые могут играть ключевую роль в регуляции трансляции ряда генов. Для исследования механизмов РНК-белкового узнавания данным классом белков нами выбран белок ProQ из *Escherichia coli*. Мы показали, что он способен специфически взаимодействовать с мрРНК *rdlD,* причем N- и С-концевые домены белка имеют разное сродство к исследуемой РНК.

***Ключевые слова**: ProQ, малые регуляторные РНК, РНК-шапероны, регуляция трансляции.*

Более двух десятилетий белок Hfq был единственным известным белком, способствующим взаимодействию малых регуляторных РНК (мрРНК) с мРНК в бактериях. Некоторые мрРНК не требуют присутствия Hfq для взаимодействия со своими мишенями, что указывает на возможность существования других бактериальных РНК-шаперонов [1]. Недавно был идентифицирован новый класс подобных белков, названный FinO, который может выполнять аналогичную Hfq роль в посттранскрипционной регуляции генов [2-4]. Белок ProQ, представитель семейства FinO, первоначально обнаружен как фактор осморегуляции, необходимый для оптимальной экспрессии белка пролинового канала ProP [5-7]. В 2016 году проведены исследования, направленные на поиск мрРНК, взаимодействующие с ProQ из *Salmonella enterica* [3]. В ходе данного исследования обнаружен обширный класс малых регуляторных РНК, которые связываются с ProQ, а также показано, что уровень экспрессии и время полужизни этих мрРНК напрямую зависит от присутствия или отсутствия данного белка [4]. Для *Legionella pneumophila* показано, что белок, гомологичный ProQ, необходим для функционирования мрРНК, участвующей в регуляции естественной компетентности бактериальных клеток [2]. Наше исследование направлено на поиск и идентификацию РНК-мишеней ProQ в *Escherichia coli*, и изучение их взаимодействия с белком ProQ.

ProQ из *E. coli* – это цитоплазматический белок, состоящий из двух доменов, соединенных длинным гибким линкером. Идентичность аминокислотной последовательности между N-концевым доменом ProQ и белком FinO из *E. coli* составляет 35% [6], а С-концевой домен гомологичен домену Тюдор [8]. На сегодняшний день получена структура целого белка с помощью метода ЯМР, однако структура комплекса белка с РНК неизвестна [8]. Основываясь на данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS) для комплекса ProQ и малой регуляторной РНК SraB, авторы предложили модель взаимодействия ProQ-РНК, в которой оба белковых домена связывают РНК. По предложенной модели, N-концевой FinO-подобный домен белка ProQ является РНК-узнающим доменом, различающим РНК-мишени, а С-концевой домен помогает в связывании РНК [8]. Предложенная модель не раскрывает подробности РНК-белкового взаимодействия и специфичности ProQ к молекулам РНК из-за низкого разрешения исходных данных.

Одной из РНК-мишеней белка ProQ из *Salmonella enterica* является малая регуляторная РНК *rdlD*. Она принадлежит к системе токсин-антитоксин I типа и ингибирует трансляцию белка-токсина за счет комплементарного взаимодействия с целевой мРНК [9]. Наличие *rdlD* РНК характерно для всех энтеробактерий, поэтому мы решили проверить, является ли данная мрРНК целевой для ProQ в клетках *Escherichia coli,* а также изучить вклад каждого из доменов в РНК-белковое взаимодействие.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование генов изолированных доменов белка ProQ из E. coli.

Гены изолированных доменов белка ProQ были амплифицированы с помощью метода ПЦР. Матрицей служила плазмида pET22b, несущая ген белка дикого типа. Гены изолированных доменов были встроены в плазмиду pProExHTb (Invitrogen, США), которая несет последовательность из 6 гистидинов и сайт TEV протеазы для ее удаления. Нуклеотидные последовательности полученных конструкций были проверены секвенированием.

Выделение белка ProQ и его изолированных доменов.

Экспрессию гена и очистку белка ProQ дикого типа проводили, как описано ранее [10]. Выделение N- и С-концевых доменов белка производилось из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных полученными плазмидами. После разрушения клеток ультразвуком клеточный дебрис осаждали центрифугированием. К супернатанту добавляли имидазол до конечной концентрации 20 мМ и наносили на колонку со смолой Ni-NTA agarose, уравновешенную буфером 0,2 М NaCl, 20мМ имидазола, 20 мМ Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4, pH 8,0. Для элюции

доменов белков использовали линейный градиент имидазола от стартового буфера до 200 мМ. Препараты белка после хроматографии на носителе Ni-NTA agarose концентрировали до 1 мл, затем наносили на колонку со смолой Superdex G75 (объем колонки 120 мл), уравновешенную буфером 200 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0.

Клонирование гена rdlD мрРНК из Escherichia coli и ее выделение.

Нуклеотидная последовательность малой регуляторной РНК *rdlD* была клонирована в вектор pUC18. Для ПЦР были использованы перекрывающиеся олигонуклеотиды-праймеры, один из которых содержал сайт для эндонуклеазы рестрикции HindIII и последовательность Т7-промотора, а второй – сайт для эндонуклеазы рестрикции SmaI. Нуклеотидные последовательности полученных конструкций были проверены секвенированием. РНК была получена с линеаризованной плазмиды транскрипцией *in vitro* с помощью Т7 РНК полимеразы. Анализ и очистку РНК транскрипта проводили с помощью электрофореза в 10 % ПААГ в присутствии 8 М мочевины. Дальнейшую очистку РНК проводили с помощью элюции из геля и анионообменной хроматографии на смоле DEAE-Sepharose.

Электрофорез РНК-белковых комплексов в ПААГ.

К раствору РНК добавляли $MgCl_2$ до конечной концентрации 10 мМ, прогревали в течение 10 мин при 60 °С, после чего охлаждали во льду. Затем добавляли белки в буфере 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 10 мМ $MgCl_2$, 200 мМ NaCl в молярном соотношении с РНК 1:1. Полученный раствор выдерживали в течение получаса при комнатной температуре. Для анализа изменения подвижности РНК-белковых комплексов в геле проводили электрофорез в 10% ПААГ, который окрашивали красителем толуидин (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие белка ProQ и его изолированных доменов с мрРНК *rdlD* исследовано методом гель-шифта. На рисунке 1 видно, что ProQ специфически взаимодействует с *rdlD*, однако не вся РНК находится в комплексе с белком.

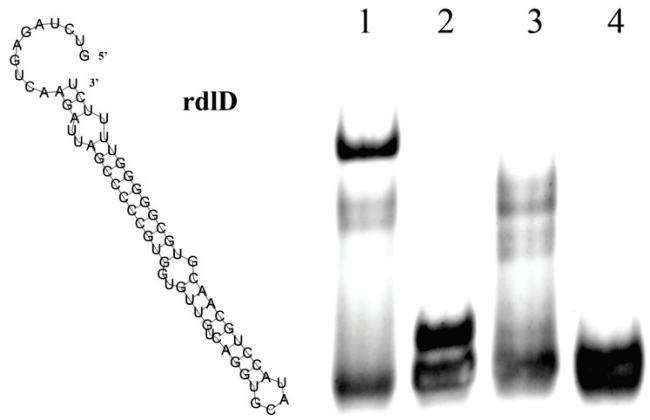


Рисунок 1. Вторичная структура мрРНК *rdlD* и электрофоретический анализ связывания *rdlD* с белком ProQ и его изолированными доменами в неденатурирующих условиях (дорожка 1 – РНК+ProQ, дорожка 2 – РНК, дорожка 3 – РНК + N-концевой домен ProQ, дорожка 4 – РНК + С-концевой домен ProQ)

Полученные результаты подтверждают выдвинутую ранее гипотезу о том, что N-концевой домен необходим для специфического узнавания РНК, а С-концевой домен лишь способствует правильной ориентации РНК в пространстве и не обладает специфическим сродством к РНК. Известно, что домен Тюдор в других белках часто задействован в связывании белков-партнеров, поэтому вполне возможно, что С-концевой домен ProQ выполняет аналогичную функцию взаимодействия с белками-регуляторами. Количественную оценку сродства ProQ и его изолированных доменов к *rdlD* мы планируем измерить, используя метод поверхностного резонанса плазмонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00073.

Список литературы / References:

1. De Lay N., Schu D., Gottesman S. Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288, pp. 7996-8003.

2. Attaiech L., Boughammoura A., Brochier-Armanet C., Allatif O., Peillard-Fiorente F., Edwards R.A., Omar A.R., MacMillan A.M., Glover M., Charpentier X. Silencing of natural transformation by an RNA chaperone and a multitarget small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, vol. 113, pp. 8813-818.

3. Smirnov A., Forstner K.U., Homqvist E., Otto A., Gunster R., Becher D., Reinhardt R., Vogel J. Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2016, vol. 113, pp. 11591-11596.

4. Smirnov A., Wang C., Drewry L.L., Vogel J. Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. *EMBO J.*, 2017, vol. 36, pp. 1029-1045.

5. Kunte H.J., Crane R.A., Culham D.E., Richmond D., Wood J.M. Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 81, pp. 1537-1543.

6. Chaulk S.G., Smith Frieday M.N., Arthur D.C., Culham D.E., Edwards R.A., Soo P., Frost L.S., Keates R.A.B., Glover J.N.M., Wood J.M. ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in Escherichia coli. *BioChemistry*, 2011, vol. 50, pp. 3095-3106.

7. Kerr C.H., Culham D.E., Marom D., Wood J.M. Salinity-dependent impacts of ProQ, Prc, and Spr deficiencies on Escherichia coli cell structure. J. Bacteriol., 2014, vol. 196, pp. 1286-1296.

8. Gonzales G.M., Hardwick S.W., Maslen S.L., Skehel J.M., Holmqvist E., Vogel J., Bateman A., Luisi B.F., Broadhurst R.W. Structure of the Escherichia coli ProQ RNA-binding protein. *RNA*, 2017, vol. 23, pp. 696-711.

9. Gottesman S. The small RNA pegulators of Escherichia coli: roles and mechanisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 58, pp. 303-328.

10. Nemchinova M., Balobanov V., Nikonova E., Lekontseva N., Mikhaylina A., Tishchenko S., Nikulin A. An experimental tool to estimate the probability of a nucleotide presence in the crystal structures of the nucleotide-protein complexes. *Protein J.*, 2017, vol. 36, pp. 157-165.

INVESTIGATION OF RNA-PROTEIN INTERACTION BETWEEN sRNA rdlD AND THE ESCHERICHIA COLI RNA CHAPERONE PROQ AS WELL AS ITS ISOLATED DOMAINS

Lekontseva N.V., Fando M.S., Mikhailina A.O., Korobeinikova A.V. and Nikulin A.D.
Institute of protein research RAS
Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

Abstract. The stability and function of sRNAs are often determined by specialized RNA-binding proteins called «RNA chaperones» which can melt RNA secondary structure. Recently has been found ProQ/FinO domain constitute a new class of RNA chaperones that can play key roles in post-transcriptional gene regulation. To study molecular mechanisms of the RNA-protein interactions carried out by this class of proteins, ProQ from *Escherichia coli* has been chosen. We have shown that the protein can specifically interact with *rdlD* sRNA and its N- and C-terminal domains possess different affinity to the sRNA.
Key words: *ProQ, sRNAs, RNA chaperones, translation regulation.*

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КЛЕТКИ *CHLORELLA VULGARIS*

Никандров В.Н., Ильючик И.А.
Полесский государственный университет
ул. Днепровской флотилии, 23, г. Пинск, 225710, Республика Беларусь; e-mail: irina.iliuchik@mail.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Методом лизиса в тонком слое агарового геля показано, что низкоскоростной супернатант гомогенатов клеток Chlorella vulgaris расщеплял казеин, желатин и фибриноген при pH 7,4 и 9,0. При pH 3,0 наблюдали только желатинолиз, а расщепление гемоглобина – лишь при pH 9,0. При добавлении в реакционную систему неорганического ортофосфата продемонстрирована реализация «фосфатного эффекта» в клетках фотосинтезирующей водоросли. Однако при действии неорганического ортофосфата выявлена новая особенность – зоны угнетения протеолитической активности, что не наблюдалась нами ранее на других объектах. В присутствии АТФ в концентрации 10^{-8} М казеинолитическая активность исследуемых образцов клеток Ch. vulgaris возрастала на 38%, а в концентрационном диапазоне 10^{-5}–10^{-4} М – на 24–29%. Вместе с тем, расщепление фибриногена угнеталось при концентрациях этого эффектора 10^{-8}, 10^{-5} и 10^{-2} М на 29, 23 и 21 % соответственно. Влияние $MnCl_2$ в диапазоне концентраций 10^{-8}–10^{-2} М на протеолитическую активность исследуемых образцов характеризовалось сложной концентрационной зависимостью, а также зависело от конкретного белка субстрата. В присутствии неорганического ортофосфата влияние катионов марганца изменялось при pH 7,4 и 9,0, но не в кислой среде. Характер изменений протеолитической активности клеток хлореллы при хлорозе позволяет думать, что состояние функциональной активности фотосинтетического аппарата отражают протеиназы, способные расщеплять казеин и фибриноген.
Ключевые слова: *расщепление белков, хлорелла, низкоскоростной супернатант, влияние pH, неорганический ортофосфат, АТФ, $MnCl_2$, хлороз.*

К числу универсальных механизмов регуляции жизнедеятельности организма относится протеолиз. Тотальный протеолиз (расщепление белка до малых пептидов и аминокислот) в физиологическом состоянии организма реализуется при пищеварении, разрушении элиминируемых из биосистемы белков, тогда как ограниченный (расщепление весьма немногих пептидных связей, нередко – даже одной) играет важную регуляторную роль в целом ряде биохимических процессов.

В целом ряде случаев значение протеолиза превосходит таковое клеточное дыхание, ибо для анаэробных организмов кислородное дыхание не является необходимым условием жизни, однако и в анаэробиозе без реализации реакций протеолиза жизнедеятельность организма невозможна. Реакции протеолиза играют ключевую роль и практически во всех основных патологических процессах. Более того, существует достаточно большой «набор» заболеваний, обусловленных дефектом генов, кодирующих образование в организме компонентов протеолиза. В предыдущих статьях [1-3] мы уже кратко останавливались на этих аспектах проблемы.

Несмотря на эти обстоятельства, физико-химические механизмы реализации протеолитических реакций и их регуляция на молекулярном и клеточном уровне все еще далеки от полной ясности.

Здесь следует иметь в виду следующее.

Краеугольные проблемы протеолиза принципиально остаются прежними:

– механизм разрыва пептидной связи в ходе энзиматического катализа;

– механизмы регуляции протеолитических процессов на всех уровнях;

– функциональная целевая значимость протеолитических реакций и их компонентов.

Как мы уже рассматривали ранее [4], основными механизмами регуляции протеолиза следует считать:

– уровень биосинтеза энзимов (часто в виде зимогенов и презимогенов);

– постсинтетический процессинг, включающий гликозилирование, ограниченный протеолиз (в ряде случаев активация зимогенов осуществляется именно так) и др.;

– взаимодействие с эндогенными ингибиторами;

– метаболитная регуляция (например, в случае АТФ-зависимого протеолиза, Ca^{2+}-активируемых протеиназ и т.д.);

– конформационные изменения молекулы протеиназы, зависящие, например, от локального окружения, а также рецепторных взаимодействий;

– изменения взаимодействия со специфическими рецепторами клеточных и субклеточных мембран;

– изменения физико-химических свойств молекулы белка субстрата вследствие замены аминокислотных остатков, гидратации и других причин.

Особенно сложная и многоплановая область – метаболическая (метаболитная) регуляция протеолиза. Метаболитов огромное множество, представления об их влиянии на протеолитические процессы довольно ограничены. Тем более, что в конкретных организмах таковое влияние может осуществляться по-разному.

Это касается и фотосинтетических организмов, наделенных рядом метаболических особенностей, отсутствующих у гетеротрофов. К подобным организмам относятся одноклеточные зеленые водоросли, в частности, *Chlorella vulgaris*.

Однако, несмотря на то, что в последние десятилетия *Chlorella vulgaris* признана перспективным промышленным биотехнологическим объектом для получения ряда высокоценных целевых продуктов, включая препараты медицинского назначения [5], в литературе имеются весьма скудные данные об особенностях организации и регуляции системы протеолиза этой водоросли. Отчасти, по-видимому, такое положение объясняется огромным разнообразием одноклеточных организмов. Имеющиеся в литературе данные посвящены, главным образом, влиянию на протеолитическую активность клеток хлореллы хлорида марганца [6, 7]. Это диктует необходимость углубленного исследования организации системы протеолиза клетки *Chlorella vulgaris* и регуляции этой системы.

Целью настоящей работы явилось выяснение расщепления внутриклеточными протеиназами *Chlorella vulgaris* различных белков субстратов, влияние на протеолитическую активность pH реакционной смеси и присутствия отдельных эффекторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали казеин по Гаммерстену (Россия), гемоглобин быка и фибриноген человека фирмы «Sigma» (США), желатин фирмы «Fluka» (Германия), бактоагар фирмы «Melford» (США), АТФ-динатриевая соль фирмы «CarlRoth» (Германия), кумасси ярко-голубой (Coomassie Blue Brilliant G-250) фирмы «Appli Chem» (Германия), другие реактивы были производства стран СНГ марки «хч».

Исследования проведены на культуре *Ch. vulgaris,* штамм *IBCE C-19* из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Водоросль выращивали на среде Тамийя [8], при температуре 25 ± 1 ºС, непрерывном барботаже культуры воздухом 25,0 л/ч, освещенности 5000 Лк, фотопериоде (свет/темнота) – 12 ч / 12 ч. Посевная доза составляла 2,87 ± 0,03 млн/мл клеток.

В фазу логарифмического роста на 7-е сутки культивирования, используя камеру Горяева, определяли концентрацию клеток, отбирали аликвоты культуры по 120±6,19 млн клеток, трижды отмывали в бидистиллированной воде.

Образцы клеток замораживали и хранили при температуре –20 ºС.

Клетки *Ch. vulgaris* разрушали в гомогенизаторе при 4 ºС в 0,5 мл бидистиллированной воды, гомогенат центрифугировали в течение 10 мин, при 8000 об/мин и 4 ºС.

Протеолитическую активность полученных образцов определяли по лизису гемоглобина, желатина, казеина и фибриногена в тонком слое агарового геля как подробно описано ранее [9].

В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали: 0,06 М Na-K фосфатный буфер pH 7,4; 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0, а также указанные буферные растворы с добавлением 0,05 М KH_2PO_4 и Na_2HPO_4. При исследовании влияния катионов марганца (II) к аликвотам образцов добавляли $MnCl_2$ в конечной концентрации 10^{-8}–10^{-2} М, а в контрольный вариант – бидистиллированную воду.

Концентрация белков-субстратов в пластине составляла – 10 г/л, агар-агара – 10 г/л, объем наносимых образцов на готовые белок-агаровые пластины супернатантов гомогенатов клеток хлореллы – 10 мкл.

Пластины инкубировали при температуре 37 ºС – 20 ч. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н хлорной кислотой.

Состояние хлороза вызывали, выращивая водоросль в условиях периодической культуры на среде Тамийя при температуре 29 ± 1 ºС, непрерывном барботаже суспензии воздухом со скоростью 5,0 л/ч, освещенности на поверхности сосуда ≈5000 Лк, фотопериоде (свет/темнота) – 12 ч / 12 ч. Посевная доза составляла 4,85 ± 0,08 млн/мл клеток. В питательную среду экспериментальных вариантов вносили $MnCl_2$ до конечной концентрации 0,01 и 137,50 мг/л. В контрольном варианте соль марганца отсутствовала. На 1 и 7-е сутки культивирования, используя камеру Горяева, определяли концентрацию клеток, отбирали аликвоты культуры содержащие по 100 ± 5,8 млн клеток, трижды отмывали в бидистиллированной воде. Дальнейшую обработку вели как описано выше.

Эксперименты проведены шестикратно. Результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента (Statistica-6).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что супернатанты гомогенатов клеток хлореллы способны расщеплять все четыре белка субстрата, однако интенсивность расщепления существенно зависела ***от pH реакционной системы*** (таблица 1). Расщепление гемоглобина наблюдалось только в щелочной среде, тогда как при pH 3,0 протеиназы супернатантов гомогенатов клеток хлореллы расщепляли только желатин. Вместе с тем, ранее мы сообщали, что в подобных супернатантах отсутствуют протеиназы, имеющие оптимум pH в кислой среде [10].

Таблица 1. Влияние pH реакционной системы на расщепление белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0, 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Величина pH	Площадь расщепления, мм^2			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
3,0	0	55,34 ± 0,62	0	0
7,4	следы	73,29 ± 2,13	58,52 ± 1,66	42,02 ± 1,53
9,0	59,49 ± 1,85	85,86 ± 2,52	82,50 ± 3,28	75,10 ± 2,21

По-видимому, такая разница обусловлена неодинаковым функциональным состоянием клетки этой водоросли.

Основываясь на материалах изучения протеолитической активности ряда условно-патогенных микроорганизмов, мы также отмечали, что хотя гемоглобин достаточно часто используют в качестве субстрата при изучении протеолитических процессов, он не всегда является оптимальным субстратом [11]. Как видно из полученных результатов, расщепление гемоглобина происходило только при pH 9,0.

Протеолиз же остальных трех белков заметно изменялся при сдвиге pH от 7,4 до 9,0. Во всех случаях наиболее интенсивно расщеплялся желатин. Однако, если при pH 7,4 желатин расщеплялся протеиназами хлореллы интенсивнее, чем казеин и фибриноген в 1,25 и 1,74 раза соответственно, то при pH 9,0 расщепление желатина отличалось от такового казеина и фибриногена лишь на 4 и 13% соответственно.

Это наводит на мысль о сложной системе протеолиза в клетках *Ch. vulgaris*, представленной набором энзимов, различающихся по типу активного центра и субстратной специфичности. Такое предположение вполне согласуется с результатами ингибиторного анализа [12].

Эффект неорганического ортофосфата. Ранее на очищенных энзимах, клетках животных и субклеточных фракциях нами было описано стимулирующее действие неорганического ортофосфата на реакции протеолиза (результаты обобщены в [1, 4, 13]). Причем, судя по данным ингибиторного анализа, включая действие разобщающего агента – 2,4-динитрофенола и цианида в ряде этот эффект не связан с ресинтезом АТФ. Это послужило основанием выдвинуть представление о существовании независимого от ресинтеза АТФ пути стимуляции протеолиза неорганическим ортофосфатом – «фосфатного эффекта».

Предварительные результаты показали, что в присутствии неорганического ортофосфата интенсивность протеолиза казеина и фибриногена существенно изменялась и различалась. Так, при концентрации неорганического ортофосфата 0,001-0,009 М фибриногенолитическая активность супернатантов подавлялась на 12-37 %, тогда как при концентрации эффектора 0,015 М и 0,045 М она возрастала на 21 и 27% соответственно (рис. 1).

Изменения казеинолитической активности носили трехфазный характер. При концентрации эффектора 0,001 М и 0,003 М эта активность возрастала на 68,5 и 122,7 % соответственно, а при концентрации неорганического ортофосфата 0,009 М она угнеталась на 37 %. Вторая фаза увеличения казеинолитической активности на 58,6-62,6 % наблюдалась в диапазоне концентраций анионов ортофосфата в диапазоне 0,030-0,060 М (все перечисленные сдвиги статистически достоверны, $P \leq 0,05$).

В данном случае проявилась сложная концентрационная зависимость, демонстрирующая не только интенсификацию расщепления белков-субстратов, но и зоны его подавления. При этом, эта картина, которая в предыдущих исследованиях нами не была зафиксирована, повторялась во всех случаях постановки данного эксперимента.

Причина проявления подобной особенности эффекта анионов неорганического ортофосфата может быть связана с метаболической спецификой данного фотосинтезирующего объекта и требует проведения дальнейших углубленных исследований.

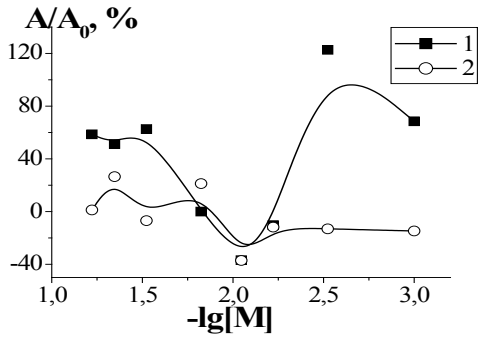


Рисунок 1. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина (1) или фибриногена (2) супернатантами гомогенатов *Chlorella vulgaris* при добавлении анионов неорганического ортофосфата, pH 7,4

Таблица 2. Расщепление белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы в присутствии 0,05 М KH_2PO_4 и Na_2HPO_4; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0, 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Величина pH	Площадь расщепления, мм^2			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
3,0	0	53,45 ± 1,67	0	0
7,4	40,74 ± 1,20	74,13 ± 3,26	51,38 ± 0,64	83,41 ± 2,99
9,0	58,87 ± 1,73	107,55 ± 3,01	63,65 ± 1,00	80,77 ± 3,19

Дальнейшие исследования на четырех белках субстратах при разных значениях pH показали, что при pH 3,0 добавление неорганического ортофосфата (правда, в фиксированной и, весьма возможно, неоптимальной концентрации) не оказало влияния на протеолитическую активность супернатантов гомогенатов хлореллы (табл. 1 и 2). Однако при pH 7,4 в присутствии ортофосфата интенсивно расщеплялся гемоглобин, в 2 раза усиливалась фибриногенолитическая активность. В щелочной среде, при H 9,0 активировалось расщепление желатина на 25 %, почти не изменялась фибриногенолитическая активность, а протеолиз казеина подавлялся на 23 % (табл. 1 и 2; все перечисленные сдвиги статистически достоверны, $P \le 0,05$). Следует, тем не менее, еще раз подчеркнуть, что эффектор был использован в точечной, неоптимальной концентрации.

Эти результаты, на наш взгляд, достаточно наглядно демонстрируют, что и в фотосинтезирующем организме проявляется «фосфатный эффект». При этом действие неорганического ортофосфата имеет особенности, ранее не наблюдавшиеся в наших исследованиях.

Эффект АТФ. Как мы уже отмечали в предыдущее статье [4], в последние десятилетия обнаружен феномен АТФ-активируемого протеолиза. Именно за открытие АТФ-активируемого убиквитин-опосредованного протеолиза и его роли в физиологии клетки в 2007 году А. Цехановеру, А. Гершко и И. Розе присуждена Нобелевская премия по химии. Описан также ряд протеиназ, которые активируются добавлением АТФ, причем, замена его нуклеотидом с меньшим количеством макроэргических связей, ведет к снижению такого эффекта. Механизм этого явления пока остается неясным.

В 1987 году нами был обнаружен и описан эффект противоположного плана. АТФ оказался способным подавлять активацию плазминогена стрептокиназой [14]. Этот эффект не зависел от количества макроэргических связей в нуклеотиде – SK-зависимая активация зимогена оказалась индифферентной к АДФ, ГТФ, ЦТФ и подавлялась еще лишь $3^1,5^1$-АМФ. Затем было обнаружено подавление АТФ в концентрации 0,01М фибринолитической активности протеиназы гриба *Arthrobotrys longa* [4].

В настоящем исследовании было установлено, что в присутствии АТФ в концентрации 10^{-8} М казеинолитическая активность исследуемых образцов клеток *Ch. vulgaris* возрастала на 38 %, а в концентрационном диапазоне 10^{-5}–10^{-4} М – на 24-29 % (табл. 3, рису. 2). Вместе с тем, расщепление фибриногена угнеталось при концентрациях этого эффектора 10^{-8}, 10^{-5} и 10^{-2} М на 29, 23 и 21 % соответственно.

Следовательно, действие АТФ характеризуется сложной концентрационной зависимостью и существенно зависит от белка субстрата. Это полностью согласуется с ранее полученными нами результатами в экспериментах на очищенных образцах протеиназ различного типа [15]. При этом были выявлены два момента:

– в ряде случаев было зафиксировано ингибирование АТФ в концентрации 10^{-3} М протеолитической активности пепсина, металлопротеиназы бацилл, а при большей концентрации нуклеотида – активности трипсина, химотрипсина, пепсина. Направленность и сила эффекта существенно зависели от белка субстрата. Это расширяло представления о феномене АТФ-ингибируемых реакциий протеолиза, но его природа остается нераскрытой;

Таблица 3. Расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* в присутствии АТФ; растворитель – 0,15 М раствор хлорида натрия pH 7,4 (n = 6)

Концентрация АТФ, М	Площадь расщепления, мм^2	
	казеина	фибриногена
Контроль (без добавок)	65,5 ± 3,8	66,2 ± 2,8
10^{-2}	77,4 ± 1,1*	52,0 ± 1,2*
10^{-3}	76,7 ± 6,7	58,7 ± 2,5
10^{-4}	84,2 ± 4,1*	64,3 ± 1,7
10^{-5}	80,6 ± 4,2*	50,9 ± 0,6*
10^{-6}	69,0 ± 2,4	60,9 ± 3,3
10^{-7}	71,6 ± 3,4	59,4 ± 2,0
10^{-8}	90,7 ± 2,5*	46,8 ± 1,3*

Примечание: *– изменения статистически достоверны при $P \le 0,05$

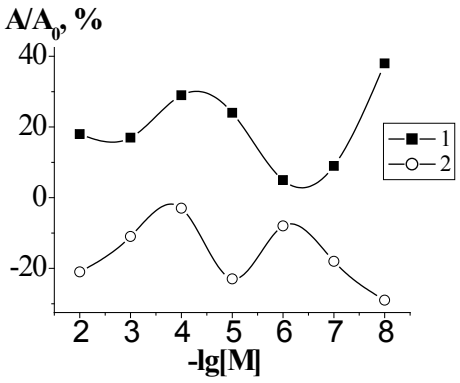


Рисунок 2. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления казеина (1) или фибриногена (2) супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при добавлении АТФ, pH 7,4

– оказалось, что феномен АТФ-активированного и неопосредованного убиквитином протеолиза распространен шире, чем это принято считать. Фактически до наших исследований активация протеолиза АТФ в подобной ситуации была показана только в отношении папаина. Мы же наблюдали этот эффект при расщеплении белков трипсином, химотрипсином, субтилизином, пепсином, а также металлопротеиназой бацилл. Механизм такой стимуляции также нуждается в проведении дальнейших исследований, тем более что в литературе нет сообщений о возможности аутофосфорилирования молекул использованных нами протеиназ.

Столь сложная и неодноплановая картина была установлена ранее на индивидуальных протеиназах. В настоящем же исследовании мы имели дело со сложной многокомпонентной системой – содержащими ряд внутриклеточных органоидов супернатантами гомогенатов клеток фотосинтезирующей водоросли. В этом аспекте необходимо проведение дальнейших исследований протеолитической активности субклеточных фракций клеток хлореллы.

Эффект катионов Mn^{2+}. К метаболическим факторам регуляции протеолиза вполне закономерно отнести и микроэлементы, в частности, марганец. Он входит в состав целого ряда энзимов, способствует интенсификации реакций карбоксилирования [16, 17]. Без марганца невозможен фотосинтез у растений и цианобактерий – при его отсутствии хлорофилл быстро разрушается на свету [16, 18]. В экстенсивной культуре при высоком содержании марганца длительно сохраняется жизнеспособность микроводорослей [5]. Однако, несмотря на важную роль марганца в живых организмах и обстоятельное изучение его биологической роли, данные литературы о влиянии солей марганца на протеолитические процессы фрагментарны [6, 7, 19–21].

Установлено, что влияние $MnCl_2$ на протеолитическую активность исследуемых образцов характеризовалось сложной концентрационной зависимостью. Так, при pH 3,0 изменения желатинолитической активности, в целом, не превышали 19%. Однако при концентрации эффектора 10^{-4}–10^{-2} М наблюдалось ее снижение на 12-17 %, тогда как при концентрации 10^{-8} и 10^{-7} М – повышение на 19 и 13 % соответственно (табл. 4, рис. 3).

Усиление расщепления желатина и казеина при pH 7,4 в присутствии данного эффектора не превысило 19 %, и лишь лизис фибриногена возрос в 1,6-1,8 раза. При pH 9,0 выявлено усиление лизиса гемоглобина в диапазоне концентраций 10^{-2}–10^{-6} М $MnCl_2$ с максимумом эффекта при 10^{-2} М – в 2,1 раза, тогда как лизис желатина возрос только на 13 % при максимальной концентрации соли, а при более низких концентрациях угнетался на 18–27% (табл. 4, рис. 4*а, б*).

В присутствии неорганического ортофосфата влияние катионов марганца изменялось. Правда, в кислой среде их эффект принципиально не отличался от описанного выше: при концентрации катионов металла 10^{-5}–10^{-4} М наблюдалось снижение желатинолитической активности на 10-12 %, тогда как при концентрации 10^{-8}–10^{-7} М – повышение на 16 % (табл. 5, рис. 3). При pH 7,4 четко проявилось расщепление гемоглобина, оно усиливалось при добавлении хлорида марганца в диапазоне концентраций 10^{-8}–10^{-4} М на 20-45 %, концентрационная зависимость приближалась к линейной с максимумом эффекта при концентрации $MnCl_2$ 10^{-8}–10^{-4} М. Лизис же фибриногена в этих условиях при добавлении Mn^{2+} усилился вдвое (табл. 5, рис. 4*в*).

На фоне ортофосфата при добавлении $MnCl_2$ желатинолитическая активность возросла на 12-60 %, а лизис казеина – на 11-54 % в обоих случаях с максимумом при 10^{-7} М $MnCl_2$. Однако лизис фибриногена, как правило, слабо угнетался с максимумом 16 и 19 % при концентрации соли 10^{-3} и 10^{-2} М соответственно.

В щелочной среде, при pH 9,0 в присутствии неорганического ортофосфата расщепление гемоглобина, желатина и казеина (но не фибриногена) возрастало на 45, 45 и 2 4% соответственно (табл. 1 и 2).

Таблица 4. Протеолитическая активность супернатантов гомогенатов клеток хлореллы при добавлении $MnCl_2$ in vitro; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Концентрация $MnCl_2$, М	Площадь расщепления, мм^2			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
	pH 3,0			
Контроль	0	55,34 ± 0,62	0	0
10^{-2}	0	48,58 ± 1,70*	0	0
10^{-3}	0	45,95 ± 1,06*	0	0
10^{-4}	0	46,00 ± 2,35*	0	0
10^{-5}	0	55,41 ± 1,66	0	0
10^{-6}	0	55,54 ± 1,03	0	0
10^{-7}	0	62,74 ± 1,42*	0	0
10^{-8}	0	65,88 ± 2,18*	0	0
Концентрация $MnCl_2$, М	pH 7,4			
Контроль	следы	73,29 ± 2,13	58,52 ± 1,66	42,02 ± 1,53
10^{-2}	следы	82,32 ± 2,05*	62,61 ± 4,13	56,24 ± 2,50*
10^{-3}	0	75,04 ± 3,91	66,15 ± 1,98*	56,94 ± 2,15*
10^{-4}	0	76,09 ± 1,60	67,24 ± 2,35*	42,96 ± 1,53
10^{-5}	0	80,89 ± 2,37*	64,72 ± 1,55*	74,87 ± 1,05*
10^{-6}	0	78,61 ± 0,64*	68,83 ± 2,06*	42,78 ± 0,88
10^{-7}	0	79,62 ± 1,05*	69,51 ± 2,65*	67,77 ± 1,44*
10^{-8}	0	71,04 ± 2,73	66,99 ± 2,90*	45,68 ± 2,44
Концентрация $MnCl_2$, М	pH 9,0			
Контроль	59,49 ± 1,85	85,86 ± 2,52	82,50 ± 3,28	75,10 ± 2,21
10^{-2}	122,25 ± 2,88*	97,15 ± 1,98*	67,95 ± 2,58*	81,87 ± 2,60
10^{-3}	97,77 ± 0,91*	87,73 ± 4,18	78,45 ± 2,35	74,92 ± 1,86
10^{-4}	70,07 ± 1,07*	79,12 ± 2,13	69,30 ± 2,97*	66,53 ± 2,12*
10^{-5}	62,12 ± 1,13	72,23 ± 2,35*	74,90 ± 2,14	68,05 ± 1,99*
10^{-6}	62,08 ± 1,62	70,86 ± 2,18*	57,73 ± 1,43*	65,93 ± 1,91*
10^{-7}	54,78 ± 1,02	70,75 ± 1,95*	75,72 ± 2,67	74,24 ± 1,29
10^{-8}	51,96 ± 0,86*	62,61 ± 2,56*	57,31 ± 2,78*	67,49 ± 1,86*

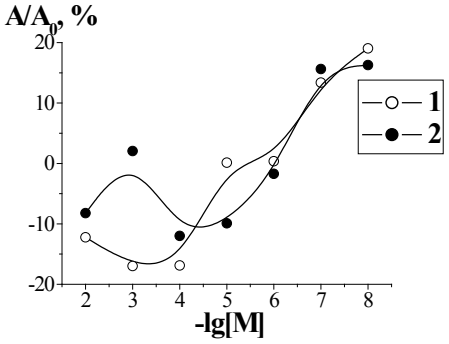


Рисунок 3. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина супернатантами гомогенатов клеток *Ch. vulgaris* под действием хлорида марганца при pH 3,0 в отсутствие (1) или в присутствии (2) неорганического ортофосфата

Таблица 5. Влияние ортофосфата на расщепление белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток хлореллы при добавлении $MnCl_2$ in vitro; растворители – 0,2 М ацетатный буфер pH 3,0; 0,05 М Tris-HCl буфер, pH 7,4 или 9,0 (n = 6)

Концентрация $MnCl_2$, М	Площадь расщепления, мм^2			
	гемоглобина	желатина	казеина	фибриногена
	pH 3,0			
Контроль	0	53,45 ± 1,67	0	0
10^{-2}	0	49,05 ± 0,44*	0	0
10^{-3}	0	54,54 ± 1,47	0	0
10^{-4}	0	47,03 ±1,32*	0	0
10^{-5}	0	48,15 ± 1,32*	0	0
10^{-6}	0	52,53 ± 3,04	0	0
10^{-7}	0	61,81 ±1,50*	0	0
10^{-8}	0	62,15 ± 1,14*	0	0
Концентрация $MnCl_2$, М	pH 7,4			
Контроль	40,74 ± 1,20	74,13 ± 3,26	51,38 ± 0,64	83,41 ± 2,99
10^{-2}	39,57 ± 1,03	82,93 ± 3,83	57,96 ± 0,95*	67,50 ± 2,23*
10^{-3}	42,62 ± 0,76	83,31 ± 3,12	57,11 ± 1,54*	70,03 ± 2,67*
10^{-4}	49,03 ± 1,01*	88,35 ± 3,67*	58,05 ± 1,08*	90,38 ± 4,14
10^{-5}	52,61 ± 1,65*	102,59 ± 1,94*	54,00 ± 1,32	79,88 ± 1,69
10^{-6}	54,43 ± 0,98*	90,51 ± 2,12*	68,58 ± 2,88*	85,41 ± 3,95
10^{-7}	55,28 ± 1,74*	118,63 ± 5,01*	79,40 ± 2,27*	78,70 ± 2,55
10^{-8}	59,12 ± 1,74*	102,44 ± 4,11*	74,02 ± 2,68*	82,33 ± 3,44
Концентрация $MnCl_2$, М	pH 9,0			
Контроль	58,87 ± 1,73	107,55 ± 3,01	63,65 ± 1,00	80,77 ± 3,19
10^{-2}	56,87 ± 2,66	78,92 ± 3,34*	39,64 ± 1,26*	76,24 ± 1,66
10^{-3}	57,13 ± 2,42	96,56 ± 2,99*	54,71 ± 1,78*	67,73 ± 1,33*
10^{-4}	54,92 ± 1,02	116,93 ± 2,42*	58,84 ± 1,33*	77,91 ± 3,05
10^{-5}	55,88 ± 2,11	117,54 ± 2,48*	70,62 ± 1,36*	89,01 ± 1,39*
10^{-6}	61,85 ± 2,09	132,12 ± 3,16*	64,93 ± 1,39	78,02 ± 1,97
10^{-7}	61,64 ± 0,95	121,10 ± 2,68*	70,02 ± 2,09*	76,05 ± 3,59
10^{-8}	64,24 ± 2,46	109,86 ± 1,62	76,31 ± 1,74*	74,81 ± 2,60

При этом во всем диапазоне концентраций $MnCl_2$ гемоглобинолитическая активность супернатантов гомогенатов хлореллы практически не менялась: колебания не превысили 9 %. Расщепление желатина подавлялось на 27 и возросло на 23 % при добавлении соли марганца в концентрации 10^{-2} и 10^{-6} М соответственно (табл. 5, рис. 4*г*). На лизис казеина добавление в данных условиях эффектора, в целом, влияло слабо – колебания активности не превысили 14 %, и лишь при концентрации 10^{-2} М выявлено подавление процесса на 38 %, а при минимальной концентрации – рост на 20 %. Еще меньшие сдвиги выявлены в расщеплении фибриногена: они не превысили 10%, и лишь при концентрации $MnCl_2$ 10^{-3} М падение активности достигало 16 %.

Состояние хлороза. Учитывая, что хлорелла является фотосинтезирующим автотрофом, изучена протеолитическая активность супернатантов гомогенатов хлореллы при хлорозе, вызванном добавлением в питательную среду хлорида марганца при изменении условий культивирования (см. методическую часть).

В контроле к 7-м суткам культивирования уровень биомассы нарастал с 3,81 ± 0,14 до 5,41 ± 0,63 млн. клеток/мл, в состоянии хлороза 7-м суткам находились 32,2% клеток (n = 6). При добавлении в питательную среду хлорида марганца в концентрации 0,01 мг/л в этот период времени уровень биомассы увеличился с 3,83 ± 0,19 до 4,25 ± 0,14 млн. клеток/мл, а в состоянии хлороза находились 79,3% клеток. В то же время при увеличении содержания марганца в питательной среде до 137,5 мг/л концентрации биомассы возросла с 5,37 ± 0,42 до11,94 ± 0,50 млн. клеток/мл, но состояния хлороза не наблюдалось.

В этих условиях в контроле на 7-е сутки желатинолитическая активность при pH 7,4 практически не менялась, тогда как казеинолитическая снижалась на 61 %, а фибриногенолитическая увеличилась в 2,5 раза (табл. 6).

При добавлении хлорида марганца в концентрации 0,01 мг/л на 7-е сутки (выраженный хлороз, превосходивший контроль более чем в 2 раза) казеинолитическая активность уменьшалась лишь на 37 %, а фибриногенолитическая возросла только на 34 %.

При максимальной концентрации хлорида марганца в питательной среде, когда явлений хлороза практически не наблюдалось, на 7-е сутки культивирования казеинолитическая активность падала на 68 %, но при этом на 20 % снижалась и фибриногенолитическая активность.

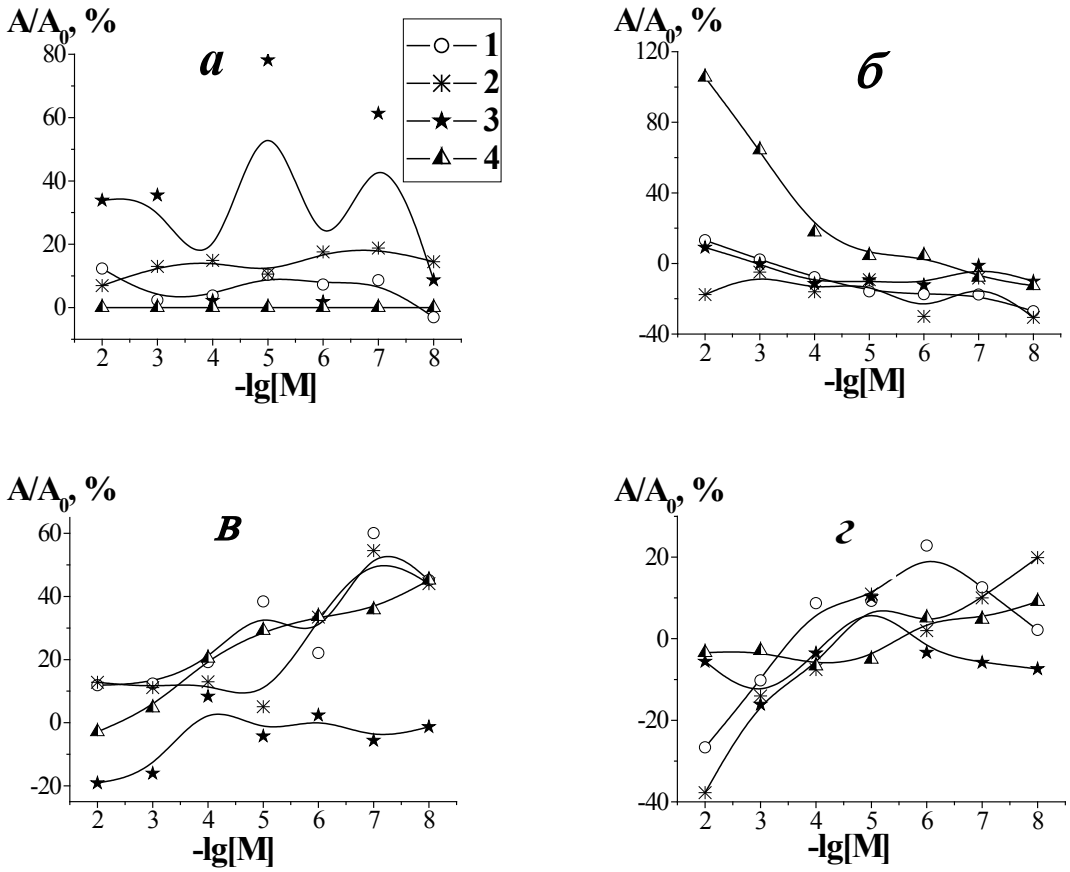


Рисунок 4. Изменения интенсивности (% к контролю, принятому за 100%) расщепления желатина (1), казеина (2), фибриногена (3), гемоглобина (4) супернатантами гомогенатов клеток хлореллы при pH 7,4 (***а, в***) или pH 9,0 (***б, г***) без добавления ортофосфата (***а, б***) или при его добавлении (***в, г***)

Разумеется, эти результаты носят предварительный характер, однако складывается впечатление, что состояние функциональной активности фотосинтетического аппарата отражают протеиназы, способные расщеплять казеин и фибриноген.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты, на наш взгляд, дают основания считать, что клетка *Ch. vulgaris* обладает многоплановым развитым набором протеиназ, раличающихся по типу активного центра и субстратной специфичности. Получено доказательство, что и в фотосинтезирующем организме проявляется «фосфатный эффект» в протеолизе. При этом действие неорганического ортофосфата имеет особенности, ранее не наблюдавшиеся в наших исследованиях – зоны подавления протеолитической активности. АТФ в широком

Таблица 6. Протеолитическая активность супернатантов гомогенатов клеток хлореллы при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду; растворитель – 0,06 М фосфатный буфер, pH 7,4 (n = 6)

Концентрация $MnCl_2$, мг/л	Площадь расщепления, мм^2					
	желатина		казеина		фибриногена	
	Время культивирования, сутки					
	1-е	7-е	1-е	7-е	1-е	7-е
Контроль	49,72 ± 3,48	51,36 ± 3,75	86,66 ± 4,59	33,59 ± 1,22	14,26 ± 1,19	35,47 ± 1,27
0,01	59,99 ± 1,26*	63,46 ± 2,58*	78,67 ± 3,19	49,68 ± 1,74*	26,07 ± 1,48*	34,99 ± 2,29
137,50	57,63 ± 0,30	60,39 ± 5,03	97,24 ± 4,23	30,68 ± 3,11	48,28 ± 2,54*	38,61 ± 2,06

диапазоне концентраций (10^{-8}–10^{-2} М), в целом, умеренно стимулировал казеинолитическую активность внутриклеточных протеиназ хлореллы, но угнетал расщепление фибриногена. Это полностью согласуется с ранее изложенными в наших статьях результатами о зависимости эффекта АТФ от белка субстрата и конкретного энзима. Влияние $MnCl_2$ на протеолитическую активность исследуемых образцов характеризовалось сложной концентрационной зависимостью, зависящей от конкретного субстрата, pH реакционной системы. Причем, в присутствии неорганического ортофосфата влияние катионов марганца изменялось, но не в кислой среде.

Изложенное наглядно демонстрирует сложную регуляцию внутриклеточного протеолиза фотосинтетической водоросли *Ch. vulgaris* и вносит вклад в развитие ранее обнаруженных феноменов «фосфатного эффекта» в протеолизе и АТФ-ингибируемых протеолитических реакций.

Более того, полученные данные позволяют предполагать, что состояние функциональной активности фотосинтетического аппарата отражают протеиназы, способные расщеплять казеин и фибриноген.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Республиканского альгологического центра Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси за предоставленную возможность работы со штаммом Chlorella vulgaris.

Список литературы / References:

1. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты. *Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук*, 2008, № 1, с. 4-22. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Proteolysis as a universal mechanism of regulation of biochemical and biological processes. Discussion aspects. *Izvestiya NAN Belarusi. Seriya meditsin. nauk*, 2008, no. 1, pp. 4-22. (In Russ.)]

2. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Реализация и регуляция протеолитических процессов на молекулярном и клеточном уровне. *Здравоохранение*, 2006, № 11, с. 4-9. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Realization and regulation of proteolytic processes at the molecular and cellular level. *Zdravoohranenie*, 2006, no. 11, pp. 4-9. (In Russ.)]

3. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Регуляция протеолиза как патогенетического звена. Некоторые проявления на молекулярном и клеточном уровнях. *Матер. II научно-практ. конфер. «Современные проблемы инфекционной патологии человека (вирусология, микробиология, иммунология, эпидемиология, клиника)»*, Минск, 2001, с. 318-338. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Regulation of proteolysis as a pathogenetic link. Some manifestations at the molecular and cellular levels. *Proceedings of II Science-Practical Conference «Sovremennyie problemyi infektsionnoy patologii cheloveka (virusologiya, mikrobiologiya, immunologiya, epidemiologiya, klinika)»*, Minsk, 2001, pp. 318-338. (In Russ.)]

4. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и прикладное значение. *Новости медико-биол. наук*, 2010, № 3, с. 14-28. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Nontrivial manifestations of proteolysis at the molecular and cellular levels, their fundamental and applied importance. *Novosti mediko-biologicheskih nauk*, 2010, no. 3, pp. 14-28. (In Russ.)]

5. Лукьянов В.А., Стифеев А.И. *Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе.* Курск: Изд-во Курской гос. сельскохоз. академии, 2014, 181 с. [Lukyanov V.A., Stifeev A.I. *Applied aspects of microalgae application in agrocenosis*. Kursk: Izdatelstvo Kurskoy gosudarstvennoy selskohozyaystvennoy akademii, 2014, 181 p. (In Russ.)]

6. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Влияние ионов марганца *in vitro* на протеолитическую активность в супернатантах гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris*. *Сб. матер. Междунар. науч.-практ. конф. по химии и хим. образованию «Менделеевские чтения 2017»*, Брест, 2017, с. 61-66. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Influence of manganese ions in vitro on proteolytic activity in supernatants of homogenates of *Chlorella vulgaris* cells. *Proceedings of International Science-Practical Conference in Chemistry and Chemistry Education «Mendeleevskie chteniya 2017»*, Brest, 2017, pp. 61-66. (In Russ.)]

7. Никандров В.Н., Ильючик И.А., Жук О.Н. Изменения расщепления белков субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при действии анионов неорганического фосфата и марганца (II) *in vitro*. *Животноводство и ветеринарная медицина*, 2017, № 4 (27), с. 67-71. [Nikandrov V.N., Ilyuchik I.A., Zhuk O.N. Changes in the cleavage of substrate proteins by supernatants of *Chlorella vulgaris* cell homogenates under the action of inorganic phosphate and manganese (II) anions in vitro. *Zhivotnovodstvo i veterinarnaya meditsina*, 2017, no. 4 (27), pp. 67-71. (In Russ.)]

8. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей* / сост. С.С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2011, 101 с. [Melnikov S.S. et al. Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae. Minsk: *Belaruskaya navuka*, 2011, 101 p. (In Russ.)]

9. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Методы исследования протеолиза. *Современные проблемы биохимии. Методы исследований.* Минск: Выш. шк., 2013, с. 132-157. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Methods for the study of proteolysis. *Sovremennyie problemyi biohimii. Metodyi issledovaniy.* Minsk: Visheyshaya shkola, 2013, pp. 132-157. (In Russ.)]

10. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Особенности расщепления белков-субстратов супернатантами гомогенатов клеток *Chlorella vulgaris* при различном значении pH. *Сб. матер. Междунар. науч.-практ. конф. по химии и хим. образованию «Менделеевские чтения 2018»*, Брест, 2018, с. 51-55. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Features of the cleavage of protein substrates with supernatants of *Chlorella vulgaris* cell homogenates at different pH

values. *Proceedings of International Science-Practical Conference in Chemistry and Chemistry Education «Mendeleevskie chteniya* 2018», Brest, 2018, pp. 51-55. (In Russ.)]

11. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Особенности набора «нейтральных» протеиназ патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. *Сб. научн. трудов «Современные проблемы инфекционной патологии человека»*, вып. 7, Минск, 2014, с. 216-223. [Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Features of a set of «neutral» proteinases of pathogenic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Digest of scientific works «Sovremennyie problemyi infektsionnoy patologii cheloveka»*, iss. 7, Minsk, 2014, pp. 216-223. (In Russ.)]

12. Ильючик И.А., Никандров В.Н. Особенности организации системы протеолиза в клетках *Chlorella vulgaris*. *Тез. докл. Междунар. науч. конф., тринадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»*, Минск, 2018, с. 112. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N. Features of the organization of the proteolysis system in *Chlorella vulgaris* cells. *Tez. doc. Intern. sci. conference, the thirteenth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists «Molekulyarnyie, membrannyie i kletochnyie osnovyi funktsionirovaniya biosistem»*, Minsk, 2018, p. 112. (In Russ.)]

13. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Some unusual manifestation of proteolysis. *Cellular and Molecular Biology*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 30-39.

14. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Вотяков В.И. Влияние адениловых нуклеотидов на активаторную функцию стрептокиназы. *Бюлл. экспер. биол. мед.*, 1987, т. 104, № 7, с. 49-51. [Nikandrov V.N., Pyzhova N.S., Votyakov V.I. Effect of adenyl nucleotides on the activator function of streptokinase. *Byulleten eksperimentalnoy biol. Meditsinyi*, 1987, vol. 104, no. 7, pp. 49-51. (In Russ.)]

15. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена. *Биоорг. химия*, 2008, т. 34, № 3, с. 382-391. [Pyzhova N.S., Nikandrov V.N. Influence of biogenic phosphates on the protein splitting with proteinases and the function of plasminogen activators. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2008, vol. 34, no. 3, pp. 382-391. (In Russ.)]

16. Schmidt S.B., Jensen P.E., Husted S. Manganese deficiency in plants: the impact photosystem II. *Trends Plant Sci.* 2016, vol. 21, no. 7, pp. 622-632.

17. Bonke E. [et al.] Manganese ions enhance mitochondrial H_2O_2 emission from Krebs cycle oxidoreductases by unducing permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, vol. 99, pp. 43-53.

18. Lin Y.T., Hoang H., Hsieh S.I., Rangel N., Foster A.L., Sampayo J.N., Lithgow G.J., Srinivasan C. Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006, vol. 40, no. 7, pp. 1185-1193.

19. Никандров В.Н., Ильюкевич В.Н., Петрова Е.И. Особенности влияния ионов Ni(II) и Mn(II) на расщепление белков-субстратов протеиназами. *Матер. X междунар. научно-практ. конф. «Актуальные проблемы экологиич. ч. 1»*, Гродно, 2014, с. 181-183. [Nikandrov V.N., Ilyukevich V.N., Petrova E.I. Features of the influence of Ni (II) and Mn (II) ions on the cleavage of protein-substrates by proteinases. *Proceedings of X International Science-Practical Conference «Aktualnyie problemyi ekologiich. ch. 1»*, Grodno, 2014, pp. 181-183. (In Russ.)]

20. Ильючик И.А., Никандров В.Н., Жук О.Н. Влияние ионов марганца(II) на рост и казеинолитическую активность микроводоросли *Scenedesmus ecornis*. *Сб статей Междунар. науч. конф., двенадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем*, ч. 2». Минск, 2016, с. 161-164. [Ilyuchik I.A., Nikandrov V.N., Zhuk O.N. Influence of manganese (II) ions on the growth and caseinolytic activity of microalgae *Scenedesmus ecornis*. *Sat articles of the Intern. sci. Conf., the twelfth congress of the Belarusian public association of photobiologists and biophysicists «Molekulyarnyie, membrannyie i kletochnyie osnovyi funktsionirovaniya biosistem, ch. 2»*. Minsk, 2016, pp. 161-164. (In Russ.)]

21. Жук О.Н., Ильючик И.А., Кульгавеня А.Д., Никандров В.Н. Влияние хлорида марганца (II) на протеолитическую активность гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном культивировании. *Вестник Полесского гос. ун-та. Сер. природоведения*, 2017, № 2, с. 62-68. [Zhuk O.N., Ilyuchik I.A., Kulgavenya A.D., Nikandrov V.N. The effect of manganese chloride (II) on the proteolytic activity of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with deep cultivation. *Vestnik Polesskogo gos. un-ta. Ser. prirodovedeniya*, 2017, no. 2, pp. 62-68. (In Russ.)]

PHYSICO-CHEMICAL FEATURES OF PROTEOLYTIC PROCESSES REALIZATION OF *CHLORELLA VULGARIS* CELL

Nikandrov V.N., Ilyuchyk I.A.
Polessky State University
Dnieper flotilla St, 23, Pinsk, 225710, Republic of Belarus; e-mail: irina.iliuchik@mail.ru

Abstract. It was shown that the low-speed supernatant of *Chlorella vulgaris* homogenates cleaved casein, gelatin and fibrinogen at pH 7.4 and 9.0. Only gelatinolysis was observed at pH 3.0, and hemoglobin cleavage – only at pH 9.0. When inorganic orthophosphate was added to the reaction system the "phosphate effect" in the photosynthesizing alga cells was demonstrated. The inorganic orthophosphate effect was accompanied with zones of proteolytic activity depressing. It was not observed on other objects earlier. In the presence of ATP concentrations 10^{-8}, 10^{-5}–10^{-4} M caseinolytic activity of *Ch. vulgaris* cells was increased for 38 and 24–29%. At the same time, the fibrinogenolysis was oppressed at ATP concentrations 10^{-8}, 10^{-5} and 10^{-2} M for 29, 23 and 21% respectively. The effect of $MnCl_2$ in10^{-8}–10^{-2} M on proteolytic activity of the studied examples was characterized by the complex concentration dependence and also depended on concrete protein substrate. In the presence of inorganic orthophosphate, the effect of manganese cations changed at pH 7.4 and 9.0, but not in acidic environment. The nature of changes of chlorella cell proteolytic activity at a chlorosis allows us to think that the functional activity state of the photosynthetic apparat is reflected by the proteinases degrading both casein and fibrinogen.

Key words: *protein cleavage, chlorella, low-rate supernatant, pH effect, inorganic orthophosphate, ATP, $MnCl_2$, chlorosis.*

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВОЗДУШНО-ПЛАЗМЕННОГО ПОТОКА, СОДЕРЖАЩЕГО NO

Соловьева А.Г., Дударь А.И., Голыгина Е.С.

ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации
пл. Минина и Пожарского, д.10/1, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: sannag5@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Работа посвящена изучению активности оксидоредуктаз при экспериментальной комбинированной термической травме после воздействия холодной плазмы, содержащей NO. Исследование проведено на 30 крысах-самцах Wistar массой 200-250 г., которых разделили на 3 группы: 1 – интактные животные, 2 – контрольная, 3 – опытная. Животным контрольной и опытной групп моделировали комбинированную термическую травму (КТТ) путем нанесения контактного ожога и термоингаляционной травмы. Животных выводили из эксперимента на 14 сутки. Крысы опытной группы после операции ежедневно облучались потоком воздушной плазмы с помощью аппарата «ПЛАЗОН» на расстоянии 1 см от ожоговой поверхности в течение 2 минут. Концентрация молекул NO в плазменном потоке (на оси плазменного потока) составляла ~3000ppm. В эритроцитах оценивали активность альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы, каталазы. Выявлено повышение удельной активности лактатдегидрогеназы в прямой и обратной реакциях, а также альдегиддегидрогеназы после применения экзогенной NO-терапии на ожоговую рану у крыс с комбинированной термической травмой. Отмечена активация работы антиоксидантных ферментов после применения «Плазона» при лечении комбинированной термической травмы.

Ключевые слова: *термическая травма, лактатдегидрогеназа, альдегиддегидрогеназа, супероксиддисмутаза, каталаза, оксид азота.*

Ожоги являются одним из широко распространенных видов травм в структуре бытового и производственного травматизма и представляют не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему [1-3]. Патогенез ожоговой болезни включает в себя нарушения функционирования антиоксидантной системы защиты организма на фоне интенсификации свободнорадикального окисления, приводя к развитию окислительного стресса [4]. Поэтому исследование особенностей антиоксидантного звена при термической травме в крови и поиск путей их коррекции является актуальным.

Местное лечение ожоговой раны является важнейшим компонентом в комплексной терапии обожженных. При лечении ожогов помимо фармакологических препаратов и хирургического метода применяют различные физические методы [5, 6]. В настоящее время остается большой интерес к изучению свойств оксида азота (NO) для лечения ран, в том числе и ожоговых. Оксид азота обладает антимикробным, цитотоксическим и цитопротективным действием, стимулирует активность фибробластов, макрофагов и кератиноцитов, индуцирует цитокины, Т-лимфоциты и иммуноглобулины, взаимодействует с кислородосодержащими радикалами и воздействует на микроциркуляцию. Оксид азота (NO) представляет собой универсальный регулятор метаболических процессов как на клеточном, так и на тканевом уровне организма человека [7]. Экзогенный NO способен проникать как через раневую поверхность, так и через неповрежденную кожу и слизистые оболочки [8]. В исследованиях было подтверждено, что местное воздействие на раневую поверхность в первую очередь обеспечивало бактерицидный эффект [9]. Доказано, что NO в составе газового потока является фактором выраженной стимуляции раневого заживления [9]. В этом плане привлекает внимание использование аппарата «ПЛАЗОН». В основу используемого в исследованиях Скальпеля-коагулятора-стимулятора воздушно-плазменного СКВП/NO-01 «ПЛАЗОН» - регистрационное удостоверение №ФСР 2007/00583 от 21 марта 2012 г. – положено воздействие на ткани организма потока газа, образованного охлаждением воздушной плазмы и содержащего молекулы NO, образующегося вследствие плазмохимических реакций [9].

Целью исследования явилось изучение активности оксидоредуктаз при комбинированной термической травме после воздействия холодной плазмы, содержащей NO.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было проведено на 30 самцах крыс линии Wistar массой 200-250 г., полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (г. Москва). Все животные содержались в стандартных условиях вивария в клетках при свободном доступе к пище и воде на рационе питания, согласно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». Условия работы с животными соответствовали правилам Европейской Конвенции ET/S 129, 1986 и директивам 86/609 ESC. Животные были разделены на 3 группы: 1 – интактные животные, 2 – контрольная, 3 – опытная. Животным контрольной и опытной групп моделировали комбинированную термическую травму (КТТ) путем нанесения контактного ожога

нагретым телом на 20 % эпилированной поверхности тела (3с), и термоингаляционной травмы (10с) продуктами горения. Животных 2 и 3 групп выводили из эксперимента на 14 сутки. Крысы опытной группы после операции ежедневно облучались потоком воздушной плазмы с помощью аппарата «ПЛАЗОН» на расстоянии 1 см от ожоговой поверхности в течение 2 минут. Концентрация молекул NO в плазменном потоке (на оси плазменного потока) составляла ~3000ppm. В гемолизате отмытых эритроцитов оценивали активность альдегиддегидрогеназы (АлДГ) [10], лактатдегидрогеназы в прямой реакции ($ЛДГ_{пр.}$) и лактатдегидрогеназы в обратной реакции ($ЛДГ_{обр.}$) [11], супероксиддисмутазы (СОД) [12], каталазы [13]. Для расчета удельной активности оксидредуктаз определяли концентрацию белка [14]. Для исследований использовали спектрофотометр Power Wave (Япония). Результаты исследований обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0, с помощью которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателей и ошибка среднего. Значимость различий между показателями определялась с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что при комбинированной термической травме удельная активность ЛДГпр уменьшилась в 2,44 раза (p=0,023), ЛДГобр – в 1,65 раза (p=0,031) по сравнению с показателями интактных крыс (табл. 1).

Рассчет соотношения ЛДГпр/ЛДГобр показал его снижение (у здоровых крыс ЛДГпр/ЛДГобр=0,798, при КТТ ЛДГпр/ЛДГобр=0,539), что свидетельствует о накоплении в крови крыс с КТТ лактата, являющегося косвенным показателем тканевой гипоксии.

Под действием экзогенной NO-терапии активность ЛДГпр увеличилась в 1,78 раза (p=0,029) по сравнению с показателем крыс с КТТ. Однако удельная активность ЛДГпр после лечения была меньше в 1,34 раза (p=0,033) по сравнению с интактными животными. При этом удельная активность ЛДГобр после воздействия NO возросла в 1,87 раза (p=0,032) по сравнению с показателем животными с КТТ без лечения, но осталась выше в 1,13 раза (p=0,024) по сравнению с интактными крысами. Показано, что удельная активность АлДГ при термической травме уменьшилась в 1,85 раза (p=0,033) по сравнению с показателем интактных крыс. Уменьшение активности фермента ведёт к накоплению большого количества высокотоксичных альдегидов, которые ингибируют активность ферментов, нарушают детоксикационную функцию печени. Благодаря применению экзогенной NO-терапии на ожоговую поверхность крыс удельная активность АлДГ в крови увеличилась в 5,98 раза (p=0,035) по сравнению с животными с КТТ без лечения.

В результате эксперимента показано снижение удельной активности СОД и каталазы на 14 сутки после нанесения КТТ в 2,1 раза (p=0,003) и в 1,6 раза (p=0,037) по сравнению с показателем здоровых крыс (табл. 2), что свидетельствует об ослаблении антиоксидантных резервов. Полученные данные соответствуют картине развивающейся гипоксии, а также динамике показателей при токсемии, заканчивающейся между 7 и 14 сутками.

Отмечено, что применение холодной плазмы с NO на ожоговую поверхность увеличивает удельную активность СОД в 1,5 раза (p=0,033) и каталазы 6,7 раза (p=0,032) по сравнению с показателями активности крыс с КТТ без лечения (табл. 2).

Таким образом, применение «Плазона» при лечении термических травм позволяет восстановить антиоксидантный статус организма, активировать энергетические и детоксикационные системы крови, что способствует увеличению скорости заживления раны.

Таблица 1. Активность альдегиддегидрогеназы, лактатдегидрогеназы при КТТ после экзогенной NO-терапии

Условия эксперимента	ЛДГпр, нмоль НАДН/мин×мг белка	ЛДГобр, нмоль НАДН/мин×мг белка	АлДГ, нмоль НАДН/мин×мг белка
Интактные крысы	73,45±3,21	91,97±4,01	20,25±1,21
КТТ	30,15±1,17*	55,88±0,494*	10,94±0,783*
КТТ+ NO-терапия	54,82±0,479*/**	104,22±1,94*/**	65,43±2,06*/**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p\leq 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с животными с КТТ ($p\leq 0,05$).

Таблица 2. Активность супероксиддисмутазы, каталазы при КТТ после экзогенной NO-терапии

Условия эксперимента	СОД (усл.ед./мин×мг белка)	Каталаза (усл.ед./мин×мг белка)
Интактные крысы	1382,35±18,61	19,04±0,82
КТТ	670,15±1,17*	11,88±0,49*
КТТ+ NO-терапия	1041,85±21,71*/**	79,90±7,16*/**

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с интактными крысами ($p\leq 0,05$); ** - различия статистически значимы по сравнению с животными с КТТ ($p\leq 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование показало, что применение экзогенной NO-терапии на ожоговую рану крыс с комбинированной термической травмой в течение 14 суток, вызвало повышение удельной активности ЛДГ в прямой и обратной реакциях. При этом отмечено резкое увеличение и удельной активности АлДГ. Выявлена активация антиоксидантных ферментов после применения «Плазона» при КТТ.

Список литературы / References:

1. Еремина Т.В. *Показатели антиоксидантной системы эритроцитов при ожоговой травме*. Автореф дис. … канд. биол. наук. Ростов-на-Дону, 1999, 23с. [Eremina T.V. *Pokazateli antioksidantnoj sistemy ehritrocitov pri ozhogovoj travme*. Avtoref dis. … kand. biol. nauk. Rostov-na-Donu, 1999, 23 p. (in Russ.)]

2. *Здравоохранение в России 2017: Статистический сборник*. М.: Росстат, 2017, 48 р. [*Zdravoohranenie v Rossii 2017: Statisticheskij sbornik*. M.: Rosstat, 2017, 48 p. (in Russ.)]

3. Пономарева Н.А., Воробьев А.В., Жегалов В.А., Перетягин С.Н. История и этапы развития комбустиологической службы в России. *Здравоохранение Российской Федерации*, 2009, № 6, с. 45-48. [Ponomareva N.A., Vorob'ev A.V., ZHegalov V.A., Peretyagin S. N. Istoriya i ehtapy razvitiya kombustiologicheskoj sluzhby v Rossii. *Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii*, 2009, no. 6, pp. 45-48. (in Russ.)]

4. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. *Ожоги: Руководство для врачей*. СПб.: СпецЛит, 2000, 480 с. [Paramonov B.A., Porembskij YA.O., YAblonskij V.G. *Ozhogi: Rukovodstvo dlya vrachej*. SPb.: SpecLit, 2000, 480 p. (in Russ.)]

5. Писаренко Л.В. *Применение плазменных потоков и жизнеспособных кожных аллотрансплататов в комплексном лечении ран*: дис. … д-ра мед. наук. М., 2004, 328 с. [Pisarenko L.V. *Primenenie plazmennyh potokov i zhiznesposobnyh kozhnyh allotransplatatov v kompleksnom lechenii ran*: dis. … d-ra med. nauk. M., 2004, 328 p. (in Russ.)]

6. Подойницына М.Г., Цепелев В.Л., Степанов А.В. Применение физических методов при лечении ожогов кожи. *Современные проблемы науки и образования*, 2015, № 5. [Podojnicyna M.G., Cepelev V.L., Stepanov A.V. Primenenie fizicheskih metodov pri lechenii ozhogov kozhi. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2015, no. 5. (in Russ.)]

7. Звягинцева Т.В., Кривошапка А.В., Желнин Е.В. Роль метаболитов оксида азота в механизмах развития экспериментального ожога. *Экспериментальная клиническая медицина*, 2011, т. 51, № 2, с. 5-9. [Zvyaginceva T.V., Krivoshapka A.V., ZHelnin E.V. Rol' metabolitov oksida azota v mekhanizmah razvitiya ehksperimental'nogo ozhoga. *Eksperimental'naya klinicheskaya medicina*, 2011, vol. 51, no. 2, pp. 5-9. (in Russ.)]

8. Василец В.Н., Шехтер А.Б. Медицинские и биологические применения плазменных источников окислов азота. *Известия высших учебных заведений. Серия: химия и химическая технология*, 2012, т. 55, № 4, с. 21-25. [Vasilec V.N., Shekhter A.B. Medicinskie i biologicheskie primeneniya plazmennyh istochnikov okislov azota. *Izvestiya vysshih uchebnyh zavedenij. Seriya: himiya i himicheskaya tekhnologiya*, 2012, vol. 55, no. 4, pp. 21-25. (in Russ.)]

9. *Скальпель-коагулятор-стимулятор воздушно-плазменный СКВП/NO-01 «Плазон»*. ТУ 9444-001-96571701-2007. Паспорт КРЛД 38642.001 ПС. Редакция от 22 сентября 2016 г. М., 2017, 28 с. [Skal'pel'-koagulyator-stimulyator vozdushno-plazmennyj SKVP/NO-01 «Plazon». TU 9444-001-96571701-2007. Pasport KRLD 38642.001 PS. Redakciya ot 22 sentyabrya 2016g. M., 2017, 28 p. (in Russ.)]

10. Кершенгольц Б.М., Серкина Е.В. Некоторые методические подходы к изучению метаболизма этанола. *Лабораторное дело*, 1981, № 2, с. 126. [Kershengol'c B.M., Serkina E.V. Nekotorye metodicheskie podhody k izucheniyu metabolizma ehtanola. *Laboratornoe delo*, 1981, no. 2, p. 126. (in Russ.)]

11. Кочетов Г.А. *Практическое руководство по энзимологии*. Москва, 1980. [Kochetov G.A. *Prakticheskoe rukovodstvo po ehnzimologii*. Moskva, 1980. (in Russ.)]

12. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопросы медицинской химии*, 1999, т. 45, № 3, с. 109-116. [Sirota T.V. Novyj podhod v issledovanii processa autookisleniya adrenalina i ispol'zovanie ego dlya izmereniya aktivnosti superoksiddismutazy. *Voprosy medicinskoj himii*, 1999, vol. 45, no. 3, pp. 109-116. (in Russ.)]

13. Сибгатуллина Г.В., Хаертдинова Л.Р., Гумерова Е.А. [и др.] *Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие*. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011, 61 с. [Sibgatullina G.V., Haertdinova L.R., Gumerova E.A. [et al.] *Metody opredeleniya redoks-statusa kul'tiviruemyh kletok rastenij: uchebno-metodicheskoe posobie*. Kazan': Kazanskij (Privolzhskij) Federal'nyj universitet, 2011, 61 p. (in Russ.)]

14. Королева О.В. *Спектрофотометрические методы биохимических исследований*. Л: Ленинградский университет, 1979, 119 с. [Koroleva O.V. *Spektrofotometricheskie metody biohimicheskih issledovanij*. L: Leningradskij universitet, 1979, 119 p. (in Russ.)]

STATE OF OXIDATIVE AND ENERGY METABOLISM OF THE BLOOD IN THERMAL INJURY UNDER THE INFLUENCE OF AIR-PLASMA FLOW CONTAINING NO

Soloveva A.G., Dudar A.I., Golgina E.S.
Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation
Nizhny Novgorod, Minin and Pozharsky square, 10/1, 603950, Russia; e-mail: sannag5@mail.ru

Abstract. The work was devoted to the study of the activity of oxidoreductases in experimental combined thermal trauma after exposure to cold plasma containing NO. The study was conducted on 30 Wistar rats weighing 200-250 g, which were divided into 3 groups: 1-intact animals, 2 – control, 3 – experimental. Animals of the control and experimental groups were modeled combined thermal trauma (CTT) by the application of the contact burn and thermoinsulation injury. Animals were taken out of the experiment on day 14. Rats of the experimental group were daily irradiated with air plasma flow after the operation using the PLASON device at a distance of 1 cm from the burn surface for 2 minutes. The concentration of NO molecules in the plasma flow was ~3000ppm. The activity of aldehyde dehydrogenase, lactate dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase was evaluated in erythrocytes. The specific activity of lactate dehydrogenase in direct and reverse reactions, as well as aldehyde dehydrogenase was increased after exogenous NO-therapy for burn wound in rats with combined thermal injury. The activation of antioxidant enzymes after the use of PLAZON in the treatment of combined thermal injury was noted.
Key words: *thermal injury, lactate dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, superoxide dismutase, catalase, nitric oxide.*

SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AMINO ACID IONIC LIQUIDS BASED ON ALKYLMETHYLIMIDAZOLIUM

Alopina E.V.[1], Smirnova N.A.[1], Kuznetsov O.Yu.[2]

[1] St. Petersburg State University

Universitetskaya nab., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia

[2] Ivanovo State Medical Academy «Roszdrava»

Ivanovo, 153000, Russia; e-mail: alopina@mail.ru

Received: 03.07.2018.

Abstract. A modification of synthesis of amino acid ionic liquids (AAILs) based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and L-Serinate anion [$C_n$mim][Ser] (n = 8, 10, 12) was developed. The structures of the AAILs based on serinate were confirmed by ^{1}H NMR and ^{13}C NMR spectroscopies. The electrical conductivity in aqueous mixtures of ionic liquids from the family 1-alkyl-3-methylimidazolium serinate [$C_n$mim][Ser] (n = 8, 10, 12) at 298.15 K were measured. The results of the electrical conductivity study clearly show that the general features of micellar aggregation of relatively long-chain imidazolium IL are analogous to those in the case of traditional surfactants. Critical micelle concentrations (cmc) of AAILs, degree of counterion binding (β), standard Gibbs energy of micellization ($\Delta G°_m$) for them were estimated from the experimental data. The dependences of the cmc, β and $\Delta G°_m$, on the length of the alkyl chain of the cations were discussed. These compounds were initially screened for biology activity by a simple zone of inhibition study against *Staphylococcus aureus* ATCC 5638 (gram-positive bacteria), *Escherichia coli* ATCC 25922 (gram-negative bacteria) and *Candida albicans* ATCC 885653 (fungus). The data obtained have shown that among AAILS the [C_{10}mim][Ser] is more effective against this bacteria.

***Key words**: amino acid ionic liquid, 1-alkyl-3-methylimidazolium cation, electrical conductivity, micellization, antibacterial effect.*

INTRODUCTION

Imidazolium-based Ionic Liquids (ILs) form a class of compounds with the number of specific physicochemical properties – such as the thermal stability, negligible vapor pressure, non-flammability. They are wildly used in «green chemistry» as solvents in synthesis and as catalysts (they can also combine these two properties), in electrochemical and extraction methods. Imidazolium ionic liquids with alkyl side chains longer than four are generally regarded as amphiphilic compounds and behave as typical cationic surfactants in aqueous solution [1-3]. The self-organization of ionic liquids in aqueous solution may have significant effects on a variety of processes such as the extraction of compounds from IL-containing systems, the synthesis and purification of bulk ILs, the formation of dispersed or phase separated systems, etc. [4]. Long-chain imidazolium-based ionic liquids can exhibit, besides to interfacial activity, significant biological activity against bacteria and fungi [4, 5]. Cornellas et al. [5] found that antimicrobial activity of amphiphilic imidazolium ILs is closely related to their surfactant properties. Likewise, toxicology data indicate a strong correlation between the length of the alkyl chain attached to the IL cation and the resulting toxicity [6]. In the present work, a series of 1-alkyl-3-methylimidazolium serinate [$C_n$mim][Ser], where n = 8, 10, 12, in aqueous solutions have been synthesized and the effect of the length of the alkyl chain on their aggregation behavior and antimicrobial activity investigated.

MATERIAL

Commercially available 1-octyl-3-methylimidazolium bromide [C_8mim]Br (97%), 1-decyl-3-methylimidazolium bromide [C_{10}mim]Br (99 %) and 1-dodecyl-3-methylimidazolium bromide [C_{12}mim]Br (98%) were purchased from Sigma-Aldrich Company and it were used without any additional purification. L- Serinate ($C_3H_7NO_3$) was purchased from Sigma-Aldrich Company (≥ 98.5 %) and it was used also without any additional purification. Acetonitrile and Methanol from Vekton (≥ 99.8 %) were used without further purification. Distilled water was used in the experiments.

Synthesis of [$C_n$mim][Ser]. Currently, one of the main methods for the synthesis of AAILs which are the derivatives of classic alkylmethylimidazolium ILs [$C_n$mim]X (X-anion) is the method proposed by K. Fukomoto and H. Ohno [7]. This method has found applications for 20 amino acids, including prolinate. The synthesis involves three stages. The first stage includes the ion exchange [$C_n$mim]Br → [$C_n$mim]OH using an anion exchange resin; in the second stage the resulting alkylmethylimidazolium hydroxide is mixed at 0ºC with the chosen amino acid taken in excess; at the end of the stage 2 the mixture contains AAIL with an excess of the amino acid; in the third step the AAIL solution is separated from the excess amino acid using MeOH/ACN (1:9) mixture, and the resultant product is dried under vacuum. This is the modification of the known AAIL synthesis method, which uses heating of the reaction mixture up to 96 ºC [8]. Essential disadvantages of the method are the low yield and the long duration of the synthesis time (12 hours + draining the reaction mixture for 48-72 hours at 80 °C).

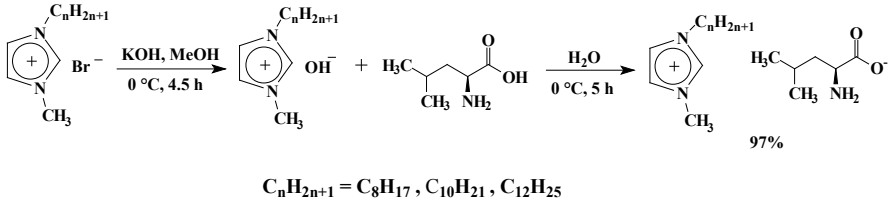


Figure 1. Synthesis route of AAIL [$C_n$mim][Ser]

In our recent studies three AAILs based on 1-alkyl-3-methylimidazolium cation and L-glutamic acid anion [$C_n$mim][Glu] (n = 4, 6, 8) were synthesized, the Fukumoto method which we have modified partly being applied [9].

The successful modification of the method, carried out by us in the synthesis of AAIL serinate [$C_n$mim][Ser] using the continuous gas extraction method [10] and methanol solution of potassium hydroxide KOH at the first stage , allowed to obtain during a day about 10 g of [$C_n$mim][Ser] (n = 8, 10, 12) with the purity ≥ 97 % (as it concerns organic constituents) and with the water content of 3-4 %.

Figure 1 presents the steps along the route of preparation of the investigated AAILs [$C_n$mim][Ser]: 1-2) Potassium hydroxide KOH (1.05 mol) in MeOH (20 mL) at 0 °C dropwise added to a stirred solution of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide [$C_n$mim]Br (1.0 mol) in MeOH (20 mL) and stirred for 4.5 h. 2-3) Then the prepared [$C_n$mim]OH separated from KBr or KCl. The methanol solution of [$C_n$mim]OH is added drop wise to the equimolar amount of the amino acid aqueous solution cooled down to 0 °C. The mixture is stirred under cooling and then it is heated up to 40 °C for 5 h. The excess residual water was removed from the filtrate under reduced pressure using the continuous gas extraction method [5]. The residual Br^- were below the detection limit of approximately 50 ppm under a test of $AgNO_3$/ HNO_3 solution. The AAIL solution has been separated from the excess amino acid using acetonitrile ACN. The products, [$C_n$mim][Ser] with the water content of 3-4 %, have been dried during two hours in the vacuum at the room temperature. [$C_n$mim][Ser] products are viscous yellow-brown liquids.

The results of ^{1}H NMR and ^{13}C NMR analysis of [C_8mim][Ser] are in a good agreement with the literature data [11]. The total peak integral in the ^{1}H NMR spectrum was found to correspond for all AAILs to a nominal purity higher than 97% (Table 1). The water content in the AAILs, determined by a volumetric Karl Fisher titration (V20 METTLER TOLEDO), was lower than 0.1 wt%.

Conductivity data. The results of the conductivity measurements for [$C_n$mim][Ser] aqueous solutions are shown in Figures 2, 3 and in Table 2, where the specific conductivity χ in dependence on the AAIL concentration is presented. A characteristic shape of the curves has been observed. They exhibit typical behavior with two linear fragments, and the concentration at which the two linear fragments intersect is assigned to the critical micelle concentration (CMC). The ratio of the slope of the linear fragments above and below the CMC gives an estimate of the degree of ionization (α) of the aggregates. The counterions binding parameter (β) gives the extent of the counterions association with the micelles and it can be estimated as $\beta = (1 - \alpha)$ [12].

The cmc values determined for [$C_n$mim][Ser] (n = 8, 10, 12) and [C_8mim]Br aqueous solutions from the electrical conductivity versus the concentration data (as the intersection points), the β value and the change of the standard Gibbs free energy ($\Delta G°_m$) in the micellization process at 298.15 K are presented in Table 2. The values of the CMC and β for [C_8mim]Br reported by Cornellas and co-workers [5] from conductivity measurements is also included in this table.

For all AAILs [$C_n$mim][Ser] (n = 8, 10, 12) the micellar self-organization in the aqueous solutions takes place. The results of the conductivity measurements obtained for [C_8mim]Br in the present study (Table 2) are in a good agreement with those reported in literature [13]. The values of the counterion binding parameter β (Table 2) increase with the length of the alkyl side chain similarly as reported for non-functionalized ILs [13]. Thus, the counter ion is stronger bonded to the aggregate as the alkyl chain becomes longer. Applying the phase separation model to the monomer-micelle equilibrium for cationic amphiphiles, one can calculate the standard Gibbs energy of micellization ($\Delta G°_m$) from the following equation [14]:

$$\Delta G°_m = (1+\beta)\, RT \ln x_{cmc} = (1+\beta)\, RT \ln \frac{Ccmc}{55.4} \quad (1)$$

Table 1. Specification of the synthesized compounds

Chemical Name	Molar Mass, g·mol^{-1}	Purification Method	Purity, Mole Fraction	Analysis Method
[C_8mim][Ser]	299.4	reprecipitation	0.975	^{1}H NMR, ^{13}C NMR
[C_{10}mim][Ser]	328.4	reprecipitation	0.973	^{1}H NMR, ^{13}C NMR
[C_{12}mim][Ser]	356.4	reprecipitation	0.978	^{1}H NMR, ^{13}C NMR

Table 2. Cmc values, degree of counter ions binding (β) and Standard Gibbs Energy of Aggregation ($\Delta G°_m$) for the ILs Aqueous Solutions at 298.15 K determined from the electric conductivity measurements in our study

IL	cmc, mmol·kg^{-1}	β	$\Delta G°_m$, kJ/mol
[C_8mim][Ser]	187	0.58	-22.45
[C_{10}mim][Ser]	68	0.63	-27.22
[C_{12}mim][Ser]	13	0.77	-33.14
[C_8mim]Br	160	0.57	-22.83

The average values obtained from two repeated experimental runs are presented. The estimated errors for cmc and β obtained from conductivity are less than 5%.

In the equation β is the fraction of counterions condensed in the micellar interface and x_{cmc} is the cmc expressed as the mole fraction unit, c_{cmc} is the cmc value in mol·dm^{-3}, and 55.4 comes from that 1 dm^3 of water corresponds to 55.4 moles of water at 298.15 K. $\Delta G°_m$ indicates the free energy difference per IL molecule between molecules in water and in micelles and also the free energy of transfer of 1 mol of IL from the aqueous pseudophase to the micellar pseudophase. The values of $\Delta G°_m$ calculated according to Eq. (1) for the ILs are presented in Table 2. These values are negative and give evidence that the micelle formation in aqueous solutions of the AAILs investigated is the spontaneous process.

Antibacterial Activity. Antimicrobial tests were carried out using Staphylococcus aureus ATCC 6538, Escherichia coli ATCC 25922 and Candida albicans ATCC 885653 cultures. The Ionic Liquids tested were dissolved in Mueller-Hinton broth (MBH) in the concentration range of 0.0005-0.0035 g/mL at 37°C and no precipitate was observed at the highest concentration of the ILs. From these qualitative experiments, all AAILs exhibited measurable antimicrobial activity (Table 3). For comparison with the literature data, the activity of bromides of 1-octyl-3-methylimidazolium was determined.

The present study confirms the existence of strong relationships between the structure, surface activity and the biological action of imidazolium based ILs on bacteria and fungi. Overall, the diameter of inhibition zone for all the tested compounds fell in the range of 27.9 mm to 35.2 mm. Among AAILs, [C_{10}mim][Ser] exhibits the highest susceptibility with inhibition zone of 39.5 ± 0.5 mm against *S. aureus*.

CONCLUSION

The successful modification of the method has been proposed by us for the synthesis of AAIL [$C_n$mim][AA] using the continuous gas extraction in metathesis reactions. We have come to the conclusion that the use of alkali instead of the anion exchange resin in the exchange reactions significantly reduces the synthesis time and the loss of the initial reagents. We found that specific solvents are needed to separate various amino acids from AAILs. The method used here allows synthesizing ionic liquids in a short time with a large amount. The present study has clarified some features of the aggregation behavior of [$C_n$mim][Ser] (n=8, 10, 12) in dilute aqueous solutions, what is of interest for colloid science. The results obtained can be helpful in the search of potential applications of [$C_n$mim][Ser] with various n as new surfactants. This study shows that amphiphilic imidazolium AAILs have antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative microorganisms and fungi. The results showed that [C_{10}mim][Ser] is more effective against tested bacteria.

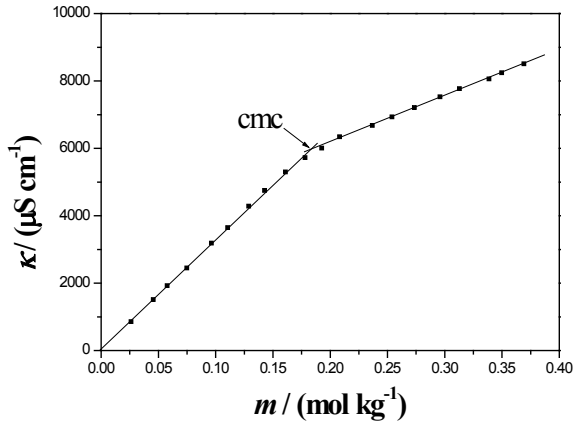


Figure 2. Specific conductivity values (κ) for aqueous solutions of [C_8mim][Ser] at various AAIL molal concentrations; T = 298.15 K

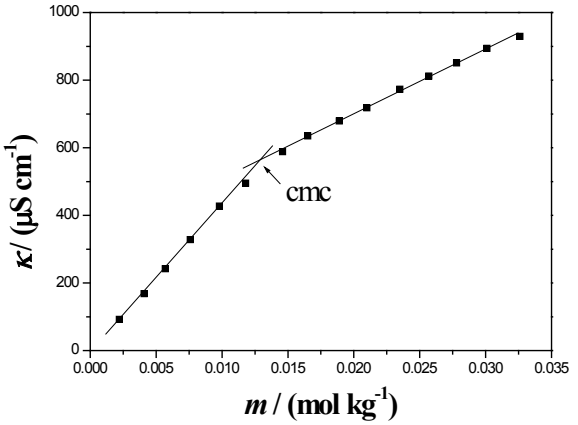


Figure 3. Specific conductivity values (κ) for aqueous solutions of [C_{12}mim][Ser] at various AAIL molal concentrations; T = 298.15 K

Table 3. Antibacterial properties of ionic liquids tested on three strains of clinical human pathogens

Antibacterial Properties	Compounds	SA	EC	CA
DIZ (mm) (mean±SD)	[C_8mim][Ser]	29.8±0.5	29.0±1.0	27.9±0.5
	[C_{10}mim][Ser]	39.5±0.5	38.4±0.5	37.7±0.5
	[C_{12}mim][Ser]	31.2±0.5	30.4±0.5	29.4±0.5
	[C_8mim][Br]	31.7±0.5	31.8±0.5	28.0±1.0

Note: SA – *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); EC – *Escherichia coli* (ATCC 25922); CA – *Candida albicans* (ATCC 885653). The DIZ value of negative control for each bacterium was 4.9 mm (bored well diameter in the agar plates). The concentration of DIZ test was 10 mg/mL.

The NMR measurements were carried out at the Center for Magnetic Resonance, St. Petersburg State University. The work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant 16-13-10042).

References:

1. Bowers J., Butts C.P., Martin P.J., Vergara-Gutierrez M.C., Heenan R.K. Aggregation behavior of aqueous solutions of ionic liquids. *Langmuir*, 2004, vol. 20, pp. 2191-2198, DOI: 10.1021/la035940m.

2. Dong B., Li N., Zheng L.Q., Yu L., Inoue T.. Surface adsorption and micelle formation of surface active ionic liquids in aqueous solution. *Langmuir*, 2007, vol. 23, pp. 4178-4182, DOI: 10.1021/la0633029.

3. Jungnickel C., Luczak J., Ranke J., Fernandez J.F., Muller A., Thoming J. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution, *Colloids Surf.-Physicochem. Eng. Asp.*, 2008, vol. 316, pp. 278-284, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2007.09.020.

4. Luczak J., Hupka J., Thoming J., Jungnickel C. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution, *Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp.*, 2008, vol. 329, pp. 125-133, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2008.07.012.

5. Cornellas A., Perez L., Comelles F., Ribosa I., Manresa A., Garcia M.T. Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium- and pyridinium-based ionic liquids in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, vol. 355, pp. 164-171, DOI: 10.1016/j.jcis.2010.11.063.

6. Garcia M.T., Gathergood N., Scammells P.J. Biodegradable ionic liquids Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem.*, 2005, vol. 7, pp. 9-14.

7. Fukumoto K., Yoshizawa M., Ohno H. Room temperature ionic liquid from 20 natural amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, pp. 2398-2399.

8. Lopp M., Boroznyak R.V. Synthesis of 1-butyl-3-methylimidazolium hydroxide and glutamate: Modification of Fukumoto' Method. *Zhurnal nauchnyh publikacij aspirantov i doktorantov*, 2011, vol. 11, pp. 1-10. (in Russ.)

9. Alopina E., Safonova E., Pukinsky I., Smirnova N. Liquid-liquid equilibria in aqueous mixtures of alkylmethylimidazolium glutamate with potassium carbonate and some physicochemical properties of aqueous [$C_n$mim][Glu] (n = 4, 6, 8) solutions. *J. Chem. Eng. Data*, 2016, vol. 61, pp. 2013-2019.

10. Dobryakov Y., Tuma D., Maurer G. Activity Coefficients at Infinite Dilution of Alkanols in the Ionic Liquids 1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate, 1-Butyl-3-methylimidazolium Methyl Sulfate, and 1-Hexyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl) Amide Using the Dilutor Technique. *J. Chem. Eng. Data*, 2008, vol. 53, pp. 2154-2162.

11. Ghanem Ou.B., Mutalib M.I.A., Lévêque J.-M., Gonfa G., Kait C., El-Harbawi M. Studies on the Physicochemical Properties of Ionic Liquids Based On 1-Octyl-3-methylimidazolium Amino Acids. *J. Chem. Eng. Data*, 2015, vol. 60, pp. 1756-1763.

12. Hoffmann H., Ulbricht W. Kinetic and thermodynamic measurements on aggregation of perfluorinated surfactants. *Z. Phys. Chem.-Frankf.*, 1977, vol. 106, pp. 167-184.

13. Wang J.J., Wang H.Y., Zhang S.L., Zhang H.H., Zhao Y. Conductivities, volumes, fluorescence, and aggregation behavior of ionic liquids [C4mim][BF4] and [Cnmim] Br (n=4, 6, 8, 10, 12) in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B*, 2007, vol. 111, pp. 6181-6188.

14. Hiemenz P.C., Rajagopalan R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. Marcel Dekker Inc, New York, 1997.

СТРУКТУРОНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ α-КРИСТАЛЛИНА

Селиванова О.М., Глякина А.В., Суворина М.Ю., Никулин А.Д., Сурин А.К., Галзитская О.В.

ФГБУН Институт белка РАН

Проспект науки, 4, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ;

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2018.

Аннотация. α-Кристаллин является основным белком хрусталика глаза позвоночных. Под α-кристаллином понимается смесь гомологичных αA- и αB- кристаллинов, которые формируют большие гетерогенные комплексы и отвечают за прозрачность хрусталика глаза. Установлено, что α-кристаллин принадлежит к семейству малых белков теплового шока (sHsp) и выполняет шапероно-подобную функцию, предотвращая денатурацию и агрегацию белков. 3D структура нативного α-кристаллина не установлена. В данной работе мы исследовали с помощью метода электронной микроскопии (ЭМ) структуру α-кристаллина из хрусталика глаза быка. Наши экспериментальные данные привели к выводу, что получить достоверную структуру α-кристаллинового комплекса невозможно. Анализ литературу по изучению α-кристаллина привел нас с заключению, что в нативных *in vivo* условиях структура и функционирование α-кристаллина может отличаться от его поведения в условиях *in vitro*. В связи с этим высказывается ряд предположений относительно функционирования α-кристаллина в виде небольших его агрегатов (например, димеров) и роли αA-кристаллина в качестве специализированного шаперона хрусталика глаза (шаперона для αB-кристаллина).

***Ключевые слова**: α-кристаллин, малые белки теплового шока, электронная микроскопия.*

ВВЕДЕНИЕ

α-Кристаллин является основным структурным белком хрусталика глаза позвоночных. Он составляет около 40 % хрусталика глаза и вместе с другими кристаллинами (β- и γ-) около 90 % всех белков волокнистых клеток хрусталика [1-6]. Концентрация α-кристаллина в хрусталике глаза чрезвычайно велика и может колебаться от 450 мг/мл у человека до 1100 мг/мл у рыб [1-7]. Такая концентрация α-кристаллина способствует созданию необходимого рефрактивного индекса хрусталика глаза (n=1,4 у человека) и именно α-кристаллин отвечает за его прозрачность (8). α-Кристаллин сформирован из αA- и αB- кристаллинов, идентичность между которыми у млекопитающих около 35 %, хотя ранее ее определяли, как 57 % [9-11]. αA- αB-Кристаллины состоят из 173 и 175 аминокислотных остатков (а.о.) и имеют молекулярную массу 19,8 и 20,0 кДа, соответственно [8, 12] из статьи). αA- и αB-Кристаллины у человека экспрессируются в разных хромосомах, соответственно в 21 и 11 [13, 14]. При этом αA-кристаллин экспрессируется в основном в хрусталике глаза, а αB-кристаллин и в других тканях: мозге, сердце, мускулатуре [15]. αB-Кристаллин связывают с различными патологиями организма, в том числе с нейродегенеративными заболеваниями [16, 17]. *In vitro* αB-кристаллин предотвращает стресс-индуцированную агрегацию различных частично развернутых белков [18, 19]. Перечень процессов с участием αB-кристаллина продолжает расти, что подчеркивает его важность в нормальном клеточном метаболизме белков. αA- и αB-изоформы α-кристаллина формируют сильно гетерогенные олигомерные комплексы, при этом в хрусталике глаза позвоночных молярное соотношение αA/αB-кристаллинов в основном составляет 3:1 [20].

Показано, что α-кристаллин относится к семейству малых белков теплового шока (sHsp) [18]. Такие белки активно экспрессируются в организме в ответ на различные стрессовые воздействия (изменение температуры, pH) и предотвращают белковую денатурацию, которая может приводить к нежелательной агрегации белков. Показано, что шаперонной активностью обладают обе изоформы α-кристаллина. Шаперонная функция α-кристаллина предотвращает агрегацию белков в хрусталике глаза и соответственно препятствует развитию катаракты. В структурном отношении как и все белки sHsp семейства αA- и αB-кристаллины состоят из трех доменов: (а) достаточно консервативного N-концевого домена длиной около 60 а.о. [11]; (б) структурно консервативного центрального домена (ACD) длиной около 90 а.о. и (в) средне консервативного С-концевого домена длиной около 25 а.о. [21]. Согласно литературным данным все три домена вовлекаются в субстратное узнавание и принимают участие в нормальном шаперонном функционировании [22].

Гетероолигомерная смесь двух изоформ α-кристаллина не может быть разделена в нативных условиях, однако показано, что обе изоформы способны формировать αA- и αB-кристаллиновые гомоолигомерные комплексы [23]. Сильная гетерогенность олигомерных комплексов α-кристаллина является препятствием для его кристаллизации и привлечения метода рентгенно-структурного анализа для структурных исследований.

Кристаллическая структура была определена только для одного представителя семейства sHsp белков из *Methanococcus jannashii* [24]. Данный белок формирует гомогенный 24 субъединичный олигомер октагедральной симметрии с внутренней полостью внутри. Данный олигомер был, видимо, взят за основу при многочисленных попытках получения модели гетероолигомерного α-кристаллинового комплекса и гомоолигомерных αA- и αB-кристаллиновых комплексов. Используя данные крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) установлено, что

наиболее гомогенным является αB-кристаллиновый комплекс. Согласно данным крио-ЭМ исследований предложена 3D модель αB-кристаллиновый комплекса с разрешением около 29 Å (при средней заложенной молекулярной массе около 650 кДа). Олигомер представляет округлую частицу из 32 мономеров и имеет полость внутри [25, 26]. Для а-кристаллина из хрусталика глаза быка получена модель с разрешением около 44Å. Данный комплекс в отличие от αB-кристаллинового комплекса не имеет выраженной полости внутри [26]. Исследования структуры рекомбинантных αA- и αB-кристаллиновых комплексов и сравнение их с аутентичным α-кристаллином из хрусталика глаза быка (αL-кристаллин) были продолжены в ряде работ с привлечением методов гель-фильтраци, аналитического центрифугирования и трансмиссионной электронной микроскопии (негативное контрастирование) (ссылки). Согласно полученным данным самым гомогенным является αB-кристаллиновй комплекс (средний коэффициент седиментации около 16,5 S), а самым гетерогенным - αL-кристаллин (20S и более) [23]. Анализ ЭМ изображений рекомбинантного αB-кристаллинового комплекса позволил предложить трехмерную модель с разрешением около 20 Å. Комплекс представляет собой округлую частицу около 13,5 нм в диаметре и имеет полость внутри. Основным строительным блоком является гексамер, построенный из 6 мономеров, четыре таких гексамера формируют 24 субъединичный αB-олигомерный кристаллиновый комплекс с полостью внутри. Данная модель была уточнена в работах [27-29] и показано, что дополнительным строительным блоком может быть димер [27, 29]. В работе [29] проведен анализ различных олигомерных образцов и показано, что они могут содержать от 12 до 48 олигомеров. При этом основным и дополнительным блоками остаются, соответственно, гексамер и димер. В это же работе была предпринята попытка связать структуру и функциональные свойства αB-кристаллинового комплекса. Известно, что sHps не являются АТФ-зависимыми шаперонами и их шаперонная активность регулируется различными путями. Для многих sHps белков фосфорилирование играет принципиальную роль [30]. В этой связи интересны исследования изменения структуры αB-кристаллинового комплекса при его фосфорилировании [29]. Показано, что дестабилизация межсубъединичных взаимодействий за счет фосфорилирования приводит к диссоциации олигомерных комплексов с образованием более мелких, преимущественно, 12- и 6- мерным ассоциатов [29]. Кроме того показано, что такая диссоциация αB-кристаллинового комплекса приводит к повышению шаперонной активности.

Следует отметить, что за последние 10 лет появилось большое количество обзоров по исследованию структурных и функциональных особенностей α-кристаллина [8, 10, 22]. Однако до сих пор нет четкого понимания связи между структурой и функцией α-кристаллина. Напротив, ставится ряд вопросов, стимулирующих дальнейшие исследования в связи чрезвычайно высокой значимостью хрусталика в жизнедеятельности организма. Эта значимость и в то же время загадочность всего процесса функционирования проистекает из того, что все существующие до настоящего времени исследования проведены в условиях in vitro и все чаще ставится вопрос – так ли все в условиях *in vivo*?

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку структурно-функциональные исследования α-кристаллина остаются актуальными мы предприняли попытку получить структурную модель аутентичного α-кристаллина из хрусталика глаза быка (αL-кристаллина). Аутентичный α-кристаллин был выделен и очищен согласно [31] с модификациями. Данный препарат сравнили с препаратом от фирмы Sigma. По данным SDS электрофореза и ЭМ анализа оба препарата идентичны (рис. 1).

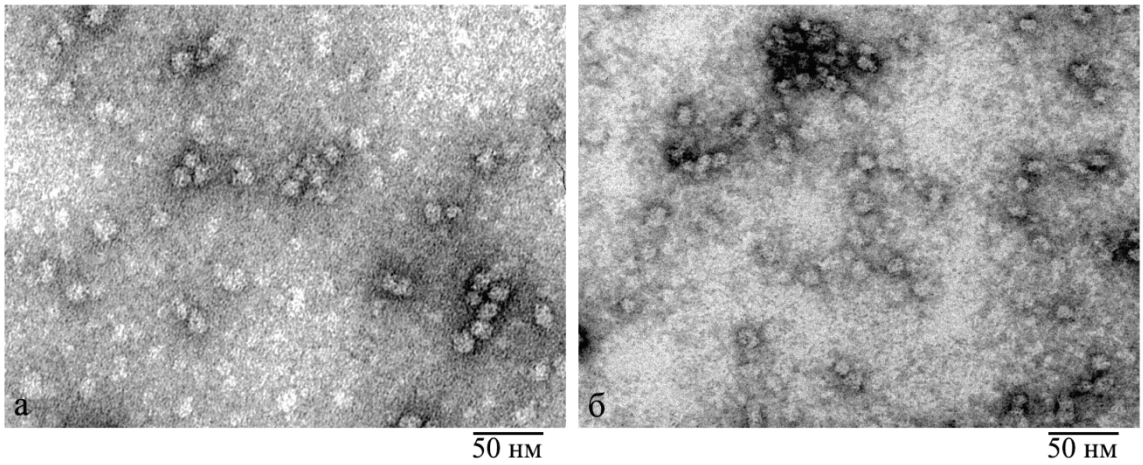


Рисунок 1. Сравнение α-кристаллиновых комплексов: (а) препарат выделен согласно [31]; (б) препарат от фирмы Sigma. На ЭМ изображениях видно, что оба препарата содержат идентичные олигомерные частицы

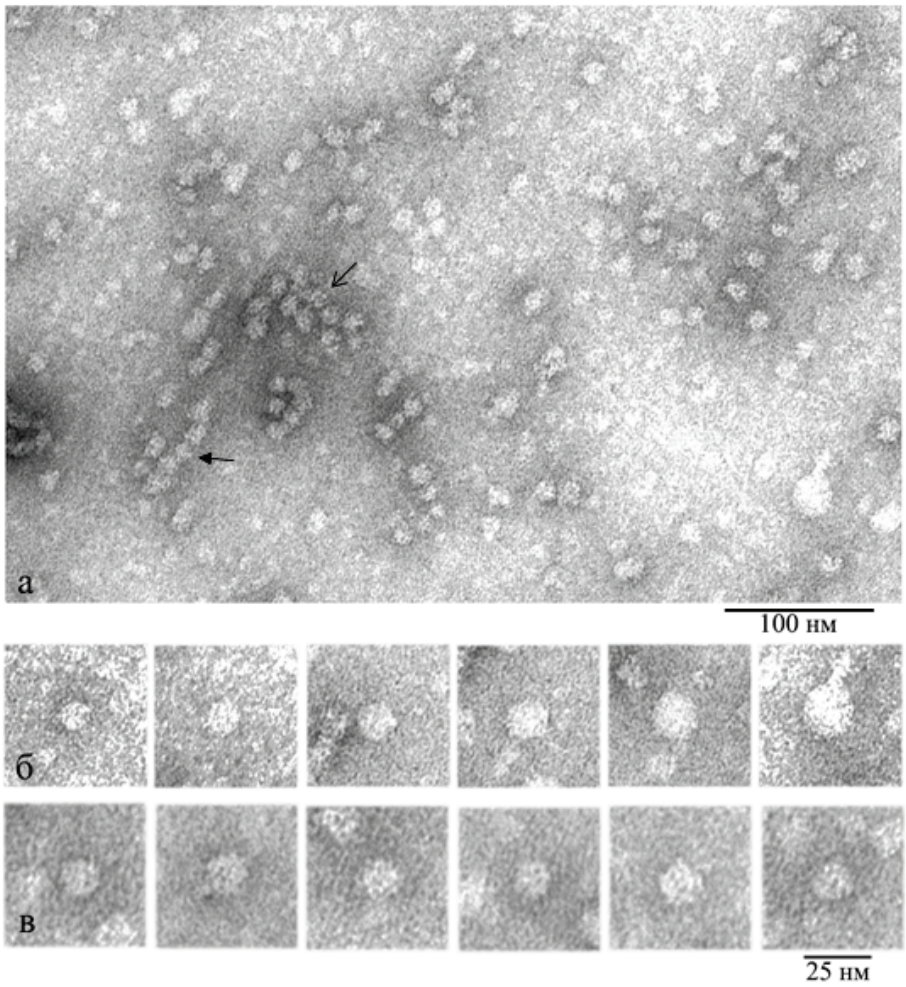


Рисунок 2. Электронно-микроскопический анализ препарата α-кристаллина из кортекса (20 mM TrisHCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM ЭДТА, 37°C): (а) – Поле препарата; (б) – олигомеры α-кристаллина разного размера; (в) – олигомеры α-кристаллина диаметром 13,5 нм. Данные частицы представляют наибольшую популяцию и были отобраны для 3D реконструкции. Открытая стрелка показывает олигомерные агрегаты. Закрытая стрелка – стопку олигомеров из 5 частиц

В дальнейших исследованиях мы использовали препарат α-кристаллина, выделенный согласно [31] и любезно предоставленный К.О. Мурановым (Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля, Москва). Согласно ЭМ исследованиям α-кристаллин представляет собой округлые олигомерные частицы диаметром 12-25 нм (рис. 2). Частицы разного размера представлены на рисунке 2б. Однако наиболее представленной является популяция частиц с диаметром около 13-14 нм (рис. 2в). Можно заметить, что на поле препарата (рис. 2а) в агрегатах частицы имеют меньшие размеры, их диаметр около 11 нм, что отражает эффект негативного контрастирования уранилацетатом. Уранилацетат не может окружить полностью частицы, и их размеры выявляются не полностью (открытая стрелка). На поле также заметны частицы, взаимодействующие друг с другом с образованием вытянутых частиц (закрытая стрелка). Кроме того, на поле наблюдаются и более мелкие частицы, которые слабо окрашиваются и при построении модели их не учитывали.

В таблице 1 представлены наиболее часто встречающиеся популяции частиц (частицы выбраны с одной ЭМ пленки). Из 1143 частиц более 50 % частиц имеет размеры около 12-14 нм. Именно такие частицы (рис. 2в) были взяты для построения 3D модели. Моделирование проводилось из обработки индивидуальных частиц с размерами около 13,5 нм и с учетом средней молекулярной массы около 650-750 кДа.

Таблица 1. Распределение α-кристаллиновых олигомерных комплексов по размерам

Диаметр (нм)	Количество частиц	%
12-14	605	53
15-19	309	27
20-25	229	20

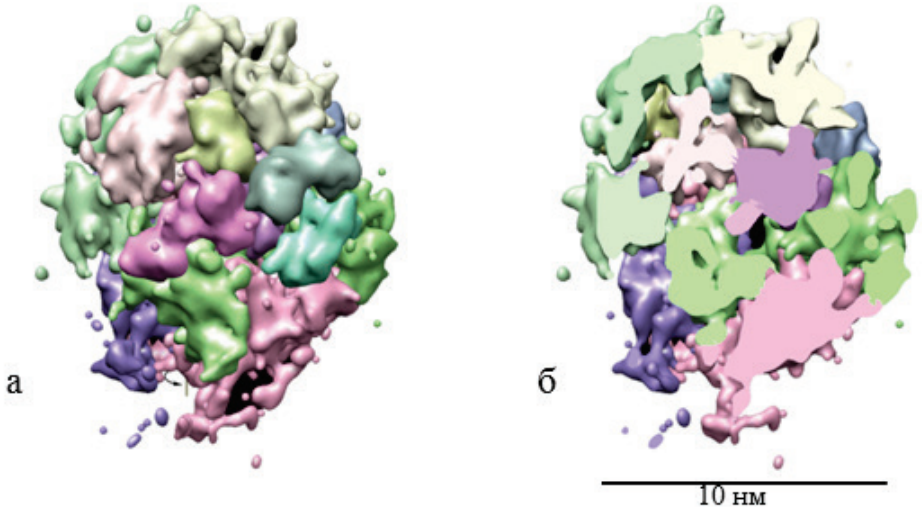


Рисунок 3. 3D реконструкция нативного α-кристаллинового комплекса из хрусталика глаза быка. Разрешение около 20 Å при FSC=0,5 и Eo-*test* критерии (Рязанцев С.Н., California NanoSystems Institute at University of California, Los Angeles, USA). При реконструкции использовали молекулярную массу 650 кДа. (а) – Общий вид модели; (б) – срез модели (сверху вниз, средняя часть). Заметно, что отсутствует выраженная полость внутри. При увеличении молекулярной массы комплекса плотность частицы повышается

Представленная модель имеет округлые очертания и слегка пониженную плотность внутри частицы (данные 3D реконструкции любезно предоставлены Рязанцевым С.Н.). Следует отметить, что для α-кристаллинового комплекса в литературе даются молекулярные массы от 300 до 1200 кДа [10, 25]. Такой же разброс встречается и для коэффициентов седиментации от 15S до 45S [23]. Однако большая часть популяции имеет коэффициент седиментации около 22 S. Мы для определения молекулярной массы α-кристаллинового комплекса воспользовались зависимость логарифма коэффициента седиментации к логарифму молекулярной массы для глобулярных белков и белковых комплексов и получили для α-кристаллинового комплекса с коэффициентом седиментации 20-22 S молекулярную массу около 740 кДа, что совпадает с экспериментально полученной средней молекулярной массой пиковой фракции α-кристаллинового комплекса [10, 32]. 3D модель на рисунке 3, представляет частицы с молекулярной массой около 650 кДа и диаметром около 13,5 нм (разрешение около 20 Å). Согласно данной модели α-кристаллиновый комплекс имеет округлую слегка эллипсоидную форму и не имеет полости внутри, что совпадает с ранее полученной 3 D моделью (крио-ЭМ) с разрешением около 44 Å [26]. Попытки получить модели от частиц с большей с молекулярной массой (700 и 750 кДа) дали сходные результаты: частицы получаются округлой слегка бобовидной формы и не имеют полости внутри. Можно лишь отметить, что повышается их плотность. Отсюда мы может сделать заключение, что получить достоверную модель гетерогенного α-кристаллинового комплекса не представляется возможным.

ОБСУЖДЕНИЕ

α-Кристаллин представляет собой высокогетерогенные комплексы с молекулярной массой 300-1200 кДа [10, 33]. При этом в большинстве работ дается средняя молекулярная масса около 700 кДа [10, 36]. Такое сильное различие в молекулярной массе определяется многими параметрами, включая температуру, концентрацию, ионную силу, метод выделения, возраст хрусталика, источник выделения [10]. Зная молекулярную массу мономера α-кристаллина, олигомерные комплексы могут содержать от 15 до 50 молекул белка, а частицы с молекулярной массой около 700 кДа до 35 мономеров. Отсюда в разных исследовательских группах при использовании сходных методах выделения и очистки белка (ионно-обменная хроматография, аналитическое центрифугирование, малоугловое рентгеновское рассеяние, динамическое рассеяние света и др.) получают для пиковых фракций различающиеся значения молекулярных масс и коэффициентов седиментации [10, 20, 23, 32-34]. При этом как правило для α-кристаллинового комплекса при средней молекулярной массе около 700 кДа определено соотношение αA- и αB-кристаллинов, как 3:1 [38]. Правильное значение молекулярной массы необходимое для получения достоверной 3D модели α-кристаллинового комплека. Это важно для определения связи между структурой и функцией комплекса. В связи с сильной гетерогенностью α-кристаллинового комплекса и невозможностью его кристаллизации на первый план выходит крио-ЭМ и ЭМ с последующей компьютерной обработкой отдельных изображений, необходимой для получения 3D модели [23, 25-28, 35]. Ранее наиболее достоверную 3D модель удалось получить для наиболее гомогенных негативно контрастированных индивидуальных частиц αB-кристаллинового комплекса [23]. Однако, наши попытки получения 3D модели негативно контрастированных частиц α-кристаллинового комплекса из хрусталика глаза быка показывает, что при сильной гетерогенности по молекулярной массе, коэффициенту седиментации и параметрам частиц получить достоверную модель невозможно. Это наводит на мысль, что в условиях *in vivo* α-кристаллин может не

образовывать олигомерные комплексы больших размеров. Косвенно на это указывает то, что αB-кристаллин, экспрессирующийся в различных тканях организма, не формирует там олигомерные комплексы [22]. В обзоре [22] высказывается предположение, что при фосфорилировании не только αB-, но и αA- и α-кристаллиновых комплекса происходит их диссоциация на более мелкие компоненты (до димеров) и при этом повышается их шаперонная активность [35]. Однако до конца данный процесс не изучен. Тем не менее, существует пример усиления шаперонной акивности для sHsp16,3 из *Mycobacterium tuberculosis*. При повышении температуры происходит диссоциация комплекса и значительное повышение шаперонной активности [36]. Возникает предположение, что диссоциация комплексов является необходимым условием повышения шаперонной активности. Т.е., изменение температуры, как возможно и других стресс факторов, может быть спусковым механизмам для проявления шаперонной активности. Это наводит на мысль, что существование ряда шаперонов в виде больших олигомерных комплексов есть эволюционное приобретение организмов для сохранности белков шаперонов в неактивной форме до стрессовых воздействий на организм.

Относительно шаперонной активности αB-кристаллина показано, что он экспрессируется во многих тканях организма и предотвращает агрегацию большого спектра белков не только в хрусталике глаза [10, 22]. В то же время αA-кристаллин обнаруживается в основном в хрусталике глаза и, видимо, является именно специализированным хрусталиковым шапероном. При нокауте по αA-кристалиновому гену у мышей развивалась катаракта, которая начиналась в ядре хрусталика и с возрастом распространялась к его периферийной кортикальной части. Кроме того, наблюдалось формирование телец включения с агрегатами αB- и γ-кристаллина [10, 37]. Т.е., αA-кристаллин необходим для сохранения прозрачности глаза и предотвращении агрегации αB-кристалина. В то же время нокаут по αB-кристаллиновому гену показал, что αB-кристаллин не является необходимым для поддержания прозрачности хрусталика на ранних этапах жизни, но при этом резко снижает ее продолжительность и проследить дальнейшее влияние на организм даннной мутации не удается [10]. Возникает предположение, что αA-кристаллин является специализированным шапероном хрусталика глаза и скорее всего является шапероном для αB- и γ-кристаллинов. Об этом косвенно свидетельствует еще ряд данных. Гены αA- и αB-кристаллинов локализованы в разных хромосомах и экспрессируются в разное время. Отмечается, что в возрастных хрусталиках происходит изменение соотношения αA- и αB-изоформ кристаллина от оптимального для млекопитающих 3:1 до 3:2, т.е. происходит уменьшение αA-кристаллиновой изоформы [38].

Хрусталик глаза обладает уникальными свойствами. Ядро хрусталика закладывается в эмбриональный период развития организма и сохраняется всю жизнь. Новые волокнистые клетки формируются на периферии ядерной области и слой за слоем увеличивают размер хрусталика. Интересной особенностью является то, что со временем в ядерных клетках хрусталика исчезает светорассеивающие органеллы - ядра, митохондрии, рибосомы, протеосомы. В связи с этим нарушается нормальный метаболизм как в центральных клетках хрусталика, так прекращается полноценная связь с периферической его частью [8, 10]. Кроме того, с возрастом происходят различные пост-трансляционные модификации белков хрусталика, что приводит к их денатурации и агрегации, следствием чего является развитие катаракты с центральной части хрусталика и распространение ее к периферии хрусталика.

За последние 40 лет проведено большое количество структурно-функциональных исследований α-кристаллина, основного белка, отвечающего за прозрачность хрусталика глаза. Однако, все более остро встает главный вопрос соотношении его структуры и функции в условиях *in vivo* и *in vitro*. Существуют ли α-кристаллиновые комплексы в условиях *in vivo*? Аномально высокая концентрация α-кристаллина в хрусталике глаза заставляет задуматься, сможет ли весь α-кристаллин при концентрации 450-500 мг/мл в виде олигомерных комплексов с молекулярной массой около 700-750 кДа и размером около 14 нм поместиться в единицу объема волокнистой клетки? Наши подсчеты показали, что в случае существования α-кристаллина в виде больших комплексов для других компонентов клетки не останется места. В случае мономерного состояния α-кристаллина или небольших его агрегатов в условиях *in vivo* остается достаточно места для других компонентов и белков волокнистых клеток. То, что при этом сохраняются шаперонные свойства α-кристаллина, свидетельствует в пользу отсутствия крупных олигомеров α-кристаллина в нативных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных и наши экспериментальные данные позволяют нам высказать ряд предположений: (1) Формирование гетерогенных комплексов α-кристаллина является эволюционным приобретением, необходимым для предотвращения кристаллизации α-кристаллина при аномально высокой его концентрации в хрусталике глаза; (2) В связи с сильной гетерогенностью α-кристаллиновых комплексов невозможно получить достоверную 3D модель α-кристаллина; (3) Олигомерное состояние α-кристаллинов можно отнести к неактивному их состоянию, поскольку при диссоциации α-кристаллиновых комплексов происходит усиление их шаперонной активности. Данная форма существования шаперонов в неактивной форме в виде комплексов, видимо, так же может быть отнесена к эволюционным приобретениям и предотвращает активное расходование белка шаперона во время отсутствия стрессовых воздействий на организм; (4) αA-кристаллин является специфическим хрусталиковым шапероном. При этом скорее всего его основным субстратным белком является αB-кристаллин; (5) В условиях *in vivo* поведение α-кристаллина и его структурное состояние может существенно отличаться от условий *in vitro*, что прежде всего связано с его высокой концентрацией (crowding

effect). Как показали наши подсчеты, только если α-кристаллин в хрусталике глаза будет находиться в мономерной форме или в виде небольших агрегатов, возможно поместить в нее остальные компоненты клетки.

Таким образом на первый план выходит задача тщательного анализа полученных в условиях *in vitro* данных по изучению структурно-функциональных особенностей α-кристаллина и разработки методов исследования α-кристаллина при высоких концентрациях, близких к условиям *in vivo*.

Работа поддержана Российским Научным Фондом грант № 18-14-00321. ЭМ исследования были проведены на базе оборудования ЦКП (№507648).

Список литературы / References:

1. Benedek G. Why the eye lens is transparent. *Nature*, 1983, vol. 302, pp. 383-384.

2. Delaye M., Tardieu A. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature*, 1983, vol. 302, pp. 415-417.

3. Philipson B. Distribution of protein within lenses with x-ray cataract. *Invest. Ophthalmol.*, 1969, vol. 8, pp. 271-280.

4. Pierscionek B.K., Augusteyn R.C. The refractive index and protein distribution in the blue eye trevally lens. *J. Am. Optom. Assoc.*, 1995, vol. 66, pp. 739-743.

5. Pierscionek B.K., Chan D.Y. Refractive index gradient of human lenses. *Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom.*, 1989, vol. 66, pp. 822-829.

6. Vérétout F., Delaye M., Tardieu A. Molecular basis of eye lens transparency. Osmotic pressure and X-ray analysis of alpha-crystallin solutions. *J. Mol. Biol.*, 1989, vol. 205, pp. 713-728.

7. Fagerholm P.P., Philipson B.T., Lindström B. Normal human lens – the distribution of protein. *Exp. Eye Res.*, 1981, vol. 33, pp. 615-620.

8. Bloemendal H., de Jong W., Jaenicke R., Lubsen N.H., Slingsby C., Tardieu A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2004, vol. 86, pp. 407-485.

9. de Jong W.W., Caspers G.J., Leunissen J.A. Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, vol. 22, pp. 151-162.

10. Horwitz J. Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.*, 2003, vol. 76, pp. 145-153.

11. Shiliaev N.G., Selivanova O.M., Galzitskaya O.V. Search for conserved amino acid residues of the α-crystallin proteins of vertebrates. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2016, vol. 14, p. 1641004.

12. Bloemendal H. The vertebrate eye lens. *Science*, 1977, vol. 197, pp. 127-138.

13. Quax-Jeuken Y., Quax W., van Rens G., Khan P.M., Bloemendal H. Complete structure of the alpha B-crystallin gene: conservation of the exon-intron distribution in the two nonlinked alpha-crystallin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, pp. 5819-5823.

14. Ngo J.T., Klisak I., Dubin R.A., Piatigorsky J., Mohandas T., Sparkes R.S., Bateman J.B. Assignment of the alpha B-crystallin gene to human chromosome 11. *Genomics*, 1989, vol. 5, pp. 665-669.

15. Srinivasan A.N., Nagineni C.N., Bhat S.P. Alpha A-crystallin is expressed in non-ocular tissues. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, pp. 23337-23341.

16. Renkawek K., de Jong W.W., Merck K.B., Frenken C.W., van Workum F.P., Bosman G.J. Alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1992, vol. 83, pp. 324-327.

17. Renkawek K., Voorter C.E., Bosman G.J., van Workum F.P., de Jong W.W. Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1994, vol. 87, pp. 155-160.

18. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, vol. 89, pp. 10449-10453.

19. Horwitz J., Huang Q.L., Ding L., Bova M.P. Lens alpha-crystallin: chaperone-like properties. *Methods Enzymol.*, 1998, vol. 290, pp. 365-383.

20. Siezen R.J., Berger H. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Size and shape studies by sedimentation, small-angle X-ray scattering and quasi-elastic light scattering. *Eur. J. Biochem.,* 1978, vol. 91, pp. 397–405.

21. de Jong W.W., Caspers G.J., Leunissen J.A. Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, vol. 22, pp. 151-162.

22. Haslbeck M., Peschek J., Buchner J., Weinkauf S. Structure and function of α-crystallins: Traversing from in vitro to in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1860, pp. 149-166.

23. Peschek J., Braun N., Franzmann T.M., Georgalis Y., Haslbeck M., Weinkauf S., Buchner J. The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, vol. 106, pp. 13272-13277.

24. Kim K.K., Kim R., Kim S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 1998, vol. 394, pp. 595-599.

25. Haley D.A., Horwitz J., Stewart P.L. The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 277, pp. 27-35.

26. Haley D.A., Bova M.P., Huang Q.L., Mchaourab H.S., Stewart P.L. Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 298, pp. 261-272.

27. Jehle S., Vollmar B.S., Bardiaux B., Dove K.K., Rajagopal P., Gonen T., Oschkinat H., Klevit R.E. N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, pp. 6409-6414.

28. Braun N., Zacharias M., Peschek J., Kastenmüller A., Zou J., Hanzlik M., Haslbeck M., Rappsilber J., Buchner J., Weinkauf S. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone αB-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S*., 2011, vol. 108, pp. 20491-20496.

29. Peschek J., Braun N., Rohrberg J., Back K.C., Kriehuber T., Kastenmuller A., Weinkauf S., Buchner J. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of αB-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, vol. 110, E3780-E3789.

30. Kampinga H.H., Garrido C. HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2012, vol. 44, pp. 1706-1710.

31. Chiou S.H., Azari P., Himmel M.E., Squire P.G. Isolation and physical characterization of bovine lens crystallins. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1979, vol. 13, pp. 409-417.

32. Spector A., Li L.K., Augusteyn R.C., Schneider A., Freund T. α-Crystallin. The isolation and characterization of distinct macromolecular fractions. *Biochem. J.*, 1971, vol. 124, pp. 337-343.

33. Siezen R.J., Bindels J.G., Hoenders H.J. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Size and charge microheterogeneity: more than 1000 different hybrids? *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 91, pp. 387-396.

34. Bloemendal H., Berns T., Zweers A., Hoenders H., Benedetti E.L. The state of aggregation of α-crystallin detected after large-scale preparation by zonal centrifugation. *Eur. J. Biochem*., 1972, vol. 24, pp. 401-406.

35. Peschek J., Braun N., Rohrberg J., Back K.C., Kriehuber T., Kastenmüller A., Weinkauf S., Buchner J. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of αB-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, vol. 110, pp. E3780-3789.

36. Gu L., Abulimiti A., Li W., Chang Z. Monodisperse Hsp16.3 Nonamer Exhibits Dynamic Dissociation and Reassociation, with the Nonamer Dissociation Prerequisite for Chaperone-like Activity. *J. Mol. Biol.*, vol. 319, pp. 517-526.

37. Brady J.P., Garland D., Duglas-Tabor Y., Robison W.G., Jr. Groome A., Wawrousek E.F. Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, vol. 94, pp. 884-889.

38. Ma Z., Hanson S.R.A., Lampi K.J., David L.L., Smith D.L., Smith J.B. Age-Related Changes in Human Lens Crystallins Identified by HPLC and Mass Spectrometry. *Exp. Eye Res.*, 1998, vol. 67, pp. 21-30.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES OF α-CRYSTALLIN

Selivanova O.M., Glyakina A.V., Suvorina M.Yu., Nikulin A.D., Surin A.K., Galzitskaya O.V.
Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences
Pushchino, 142290, Moscow Region, Russia; e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Abstract. α-Crystallin is the basic protein of the eye lens of vertebrates. It represents a mixture of homologous αA- and αB-crystallins which form large heterogeneous complexes and provide for eye lens transparency. It was established that α-crystallin belongs to the family of small heat shock proteins (sHsp) and performs a chaperone-like function preventing denaturation and aggregation of proteins. The 3D-structure of native α-crystallin has not yet been determined. In this study we have analyzed the structure of α-crystallin from bovine eye lens using the electron microscopy (EM) method. Our experimental data have allowed us to conclude that it is impossible to obtain a reliable structure of the α-crystallin complex. Based on the analysis of the publications devoted to studying α-crystallin we have come to the conclusion that under native *in vivo* conditions the structure and functioning of α-crystallin can differ from its behavior under *in vitro* conditions. Therefore several assumptions are made concerning the functioning of α-crystallin in the form of small aggregates, for example dimers, and the role of αA-crystallin as a specified chaperone of eye lens – the chaperone for αB-crystallin.

Key words: *α-crystallin, small heat-shock proteins, electron microscopy.*

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ В МАЛЫХ ДОЗАХ НА ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

Гринберг М.А., Громова Е.Н., Гудков С.В., Воденеев В.А.
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: mag1355@yandex.ru
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Изучение физиологических процессов растений и их адаптации к стресс-факторам в условиях постоянно действующего повышенного радиационного фона значимо в связи с наличием радиационных загрязнений, связанных с деятельностью человека. Целью работы является изучение влияния хронического облучения в малой дозе на электрогенез и фотосинтетическую активность проростков гороха. Объект исследований – 17-дневные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Источник ионизирующего излучения (ИИ) – система ^{90}Sr-^{90}Y с активностью 0,1 МБк. Суммарная накопленная доза составляла около 12,7 мГр. В ходе работы выполнены измерения активности фотосинтеза, параметров электрических сигналов и вызываемых ими ответов фотосинтеза. Обнаружен стимулирующий эффект ИИ на интенсивность ассимиляции (A) и максимальную эффективность фотосинтеза (Fv/Fm) при неизменных значениях квантовых выходов фотосистем I и II (Y(I) и Y(II)). Амплитуда электрических сигналов, а также интенсивность вызываемых ими ответов фотосинтеза демонстрировали тенденцию к снижению.
Ключевые слова: *ионизирующее излучение, малые дозы, регуляция фотосинтеза, электрические сигналы.*

Растения не способны активно избегать действия неблагоприятных факторов окружающей среды, однако в процессе эволюции у них выработались крайне эффективные механизмы, позволяющие им приспосабливаться к различным окружающим условиям, в том числе к повышенному радиационному фону. В силу естественных и антропогенных причин радиационный фон, составляющий в среднем 0,1-0,2 мкЗв/час [1], может быть повышен в десятки и сотни раз достигая в существующих в настоящее время очагах загрязнений значений 400 мкЗв/час и более [2]. Этот дозовый диапазон, относящийся к малым дозам, интересен для изучения не только в силу своей практической значимости, но и из-за сложных нелинейных закономерностей, которые для него свойственны.

В литературе отсутствует единый взгляд на определение границ малых доз для растений. Если относить к этому диапазону дозы, при которых через значимый объём (ядро клетки со средним диаметром 8 мкм) проходит не более одной частицы или кванта ИИ, значения не превышают 0,02-0,06 сГр [3, 4]. Научный комитет по действию атомной радиации при ООН (НКДАР) рассматривает более широкий диапазон и рекомендует относить к малым дозы ионизирующего излучения (ИИ) менее 200 мГр, а к малым мощностям доз – менее 1,5 мГр/мин [5]. Подобные определения неудобны в случае радиоустойчивых организмов, к которым, в частности, относят растения, поэтому на практике, как правило, малыми считают дозы, значения которых начинаются на уровне один-два порядка выше естественного радиационного фона, т.е. составляет 1-40 сГр [6], а заканчиваются уровнем на один-два порядка ниже летальной дозы ($ЛД_{50}$) для рассматриваемого вида. В этом случае для растений верхний порог малых доз находится на уровне 2-5 Гр [3]. Кроме того, существует подход, описывающий низкодозовое облучение как диапазон доз, в котором наблюдается нелинейный биологический ответ, отличающийся по проявлению от эффектов, возникающих при высоких дозах [4, 7].

При работе с хроническим ИИ в малых дозах внимание исследователей сосредоточенно преимущественно на изучении морфометрических и генетических изменений у растений. В большом количестве работ отмечен стимулирующий эффект малых доз ИИ на рост и развитие растений [8-10]. Однако, в пределах данного диапазона доз уже могут проявляться негативные эффекты [11]. В отличие от интегральных показателей, характеризирующих рост растений, информация об изменении активности физиологических процессов под влиянием малых доз ИИ практически отсутствует. Важнейшим физиологическим процессом, обеспечивающим растения энергией и органическими соединениями, является фотосинтез. В отдельных работах представлена информация о влиянии малых доз ИИ на фотосинтез. Так, у проростков *Arabidopsis thaliana* показано вызванное облучением повышение таких параметров световой стадии фотосинтеза как квантовый выход фотосистемы II (Y(II)) и скорость переноса электронов по цепи (ETR) при сниженном нефотохимическом тушении флуоресценции (NPQ) и неизменном содержании хлорофилла [12, 13]. При хроническом облучении растений ряски (*Lemna minor* L.) зарегистрировано увеличение экспрессии большого количества связанных с фотосинтезом генов и максимального уровня ассимиляции [10]. Однако измерения, выполненные на проростках сосен (*Pinus strobus* L. и *Pinus sylvestris* L.), напротив, демонстрируют существенное снижение ассимиляции при облучении с аналогичной мощностью дозы [11]. Несмотря на наличие отдельных сведений о влиянии ИИ в малых дозах как на фотосинтез в целом, так и на некоторые его этапы, механизмы этого влияния изучены недостаточно. Кроме того, в литературе совершенно отсутствует информация об эффектах, оказываемых ИИ на регуляцию фотосинтеза другими стрессорами, что особенно важно при анализе действия повышенного радиационного фона в природных условиях, где имеет место сочетанное действие радиации и различных биотических и абиотических факторов, к которым растению необходимо адаптироваться.

Развитие адаптации – комплексный процесс, требующий координации различных частей растения посредством дистанционных сигналов. Дистанционные сигналы, в том числе электрические, по ходу распространения вызывают широкий спектр физиологических ответов, включая временное подавление фотосинтеза, активацию дыхания, изменение экспрессии генов и др. [14, 15]. Предполагается, что электрические сигналы (ЭС) способствует неспецифической адаптации растений при действии быстронарастающих стрессовых факторов среды, таких как повышение температуры, механические повреждения, атака листогрызущих насекомых и т.д. [16, 17]. Поскольку ЭС претерпевают изменения под действием ИИ [18], вопрос о способности растений подстраиваться к быстро изменяющимся условиям среды на фоне повышенной радиационной нагрузки требует изучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования и условия облучения.

Исследования проводили на 17-дневных проростках гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Семена проращивали в течение 3-х дней в дистиллированной воде, после чего проростки пересаживали в сосуды с песком. Полив производили 1 раз в двое суток водопроводной водой. Растения выращивались в условиях 16-ти часового светового периода при среднесуточной температуре 25˚С.

Для облучения использовали закрытый источник ^{90}Sr-^{90}Y, являющийся чистым β-излучателем. Источник ИИ располагался над растениями на, расстояние от радиоактивного источника до поверхности почвы – 30 см. Активность источника составляла 0,1 МБк, мощность дозы – примерно 31,3 мкЗв/час. Облучение начиналось со дня замачивания семян и продолжалось на протяжении всего периода выращивания растений, общее время облучения 17 дней. Суммарная накопленная доза составляла около 12,7 мГр.

Контрольные растения выращивались в аналогичных условиях в отсутствии источника ИИ.

Измерение параметров фотосинтеза.

Параметры фотосинтеза измерялись на 2-м (сверху) взрослом листе проростка гороха. Для регистрации активности фотосинтеза и транспирации использовался инфракрасный газоанализатор GFS-3000 и PAM-флуориметр Dual-PAM-100 с измерительной головкой Dual-PAM gas-exchange Cuvette 3010-Dual. К измеряемым параметрам относились ассимиляция (A), транспирация (E), максимальная эффективность фотосинтеза (Fv/Fm), квантовый выход фотосистемы I (Y(I)), квантовый выход фотосистемы II (Y(II)), нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ).

Расчёт параметров квантового выхода фотохимических реакций фотосистемы I (Y(I)) и фотосистемы II (Y(II)), максимальной эффективности фотосинтеза (Fv/Fm) и нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) производился встроенным программным обеспечением прибора согласно [19, 20] по следующим формулам:

$$Y(I) = (P_m' - P)/P_m,$$

где P_m – максимальное изменение сигнала P700 фотосистемы I, отражающее полное окисление P700; P'_m – максимальное изменение сигнала P700 на свету; P – текущий уровень сигнала P700;

$$Y(II) = (F_m' - F)/F_m',$$

где F_m – максимальный выход флуоресценции; F'_m – максимальный выход флуоресценции на свету; F – текущий уровень флуоресценции;

$$F_v/F_m = (F_m - F)/F_m;$$
$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'.$$

Актиничный свет подавался на длине волны 460 нм с мощностью 239 μмоль м$^{-2}$ с$^{-1}$. Насыщающие вспышки генерировались на длине волны 635 нм с мощностью 9000 μмоль м$^{-2}$ с$^{-1}$. Длительность насыщающих вспышек 300 мс, промежуток между вспышками – 10 с. В измерительной кювете концентрация CO_2 поддерживалась на уровне 360 μмоль моль$^{-1}$, температура 23 °С, относительная влажность 60 %. Площадь измеряемого участка листа 1,3 см^2.

Регистрация электрической активности и индуцированных электрическими сигналами ответов фотосинтеза.

Регистрация поверхностных потенциалов производилась при помощи стеклянных макроэлектродов с хлорсеребряной проволокой, заполненными 3 М KCl. Контакт электрода с растением осуществлялся через хлопково-шерстяную нить, пропитанную стандартным раствором (1 мМ KCl, 0,5 мМ $CaCl_2$, 0,1 мМ NaCl). Разность потенциалов регистрировалась многоканальной системой для измерения биопотенциалов и ионных токов Мультитест ИПЛ-113 и обрабатывались на ПК в программе param2.

ЭС индуцировался постепенным нагревом 3-го (сверху) взрослого листа в кювете с водой (рис. 1). Температура воды достигала 61-63°С. Макроэлектроды располагались на стебле над 3-м листом и на 2-м парном измеряемому листе. Электрод сравнения располагался в песке.

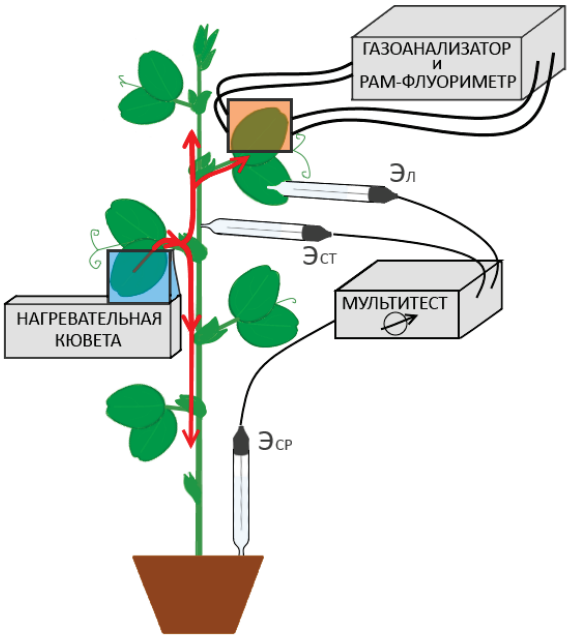


Рисунок 1. Схема регистрации параметров фотосинтеза при прохождении электрического сигнала; красная стрелка – распространение электрического сигнала, $Э_{ст}$ – электрод, расположенный на стебле, $Э_{л}$ – электрод, расположенный на листе, $Э_{ср}$ – электрод сравнения

Через 15 минут после фиксации листа в измерительной кювете начиналась запись темновых параметров ассимиляции и транспирации, а также величины поверхностного потенциала (45 минут). После этого включались вспышки света. После стабилизации всех измеряемых параметров (1 час 15 мин после фиксации растения, 15 минут после включения света) начинался нагрев кюветы с водой. Нагрев прекращался по достижении 60°C (6 мин), что приводило к возникновению ЭС в течение последующих 2 мин в 100 % экспериментов. После прохождения ЭС запись продолжалась ещё 45-60 минут.

Статистическая обработка.

Биологическая повторность экспериментов для каждой группы составляла 8-12 растений. Результаты представлены в виде типичных записей, средних значений и ошибок среднего. Статистическая значимость различий оценивалась по t-тесту Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления стадий процесса фотосинтеза, чувствительных к действию малых доз ИИ, рассматривали ключевые параметры, характеризующие функционирование как световой, так и темновой стадий. В качестве показателей светозависимых реакций были выбраны максимальная эффективность фотосинтеза (Fv/Fm), отражающая количество открытых реакционных центров, квантовые выходы фотосистем I и II (Y(I) и Y(II)), указывающие на эффективность их работы в адаптированном к свету состоянии, и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ), показывающее количество рассеянной энергии поглощённого света. Снижение Fv/Fm, Y(I), Y(II) и возрастание NPQ наблюдается при действии многих биотических и абиотических факторов и свидетельствует о развитии стресса у растения. В качестве интегрального показателя темновой стадии и процесса фотосинтеза в целом рассматривали интенсивность ассимиляции (A), т.е. способность растения поглощать и восстанавливать углекислый газ. Одной из главных лимитирующих стадий этого процесса является проникновение CO_2 в межклеточное пространство, регулируемое устьичной проводимостью. Интенсивность газообмена через устьица определялась по величине транспирации (E).

Под действием облучения по ряду основных параметров фотосинтеза наблюдается слабый стимулирующий эффект. В частности, обнаружено статистически значимое ($p<0,05$) увеличение амплитуды возрастания ассимиляции (A) на включение света – интегрального показателя фотосинтеза (рис. 2). Устьичная проводимость, оцениваемая по величине транспирации (E), при этом достоверно снижается. Это указывает на то, что доступность CO_2 по-видимому, не является определяющим фактором при активации фотосинтеза ионизирующим излучением. Вероятными причинами возрастания ассимиляции в данном случае является полученное в эксперименте увеличение максимальной эффективности фотосинтеза (Fv/Fm), возможна также активация работы ферментов темновой стадии. Однако у облучаемых растений было обнаружено незначительное повышение нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ), что может указывать на слабый окислительный стресс, возникающий под действием ИИ.

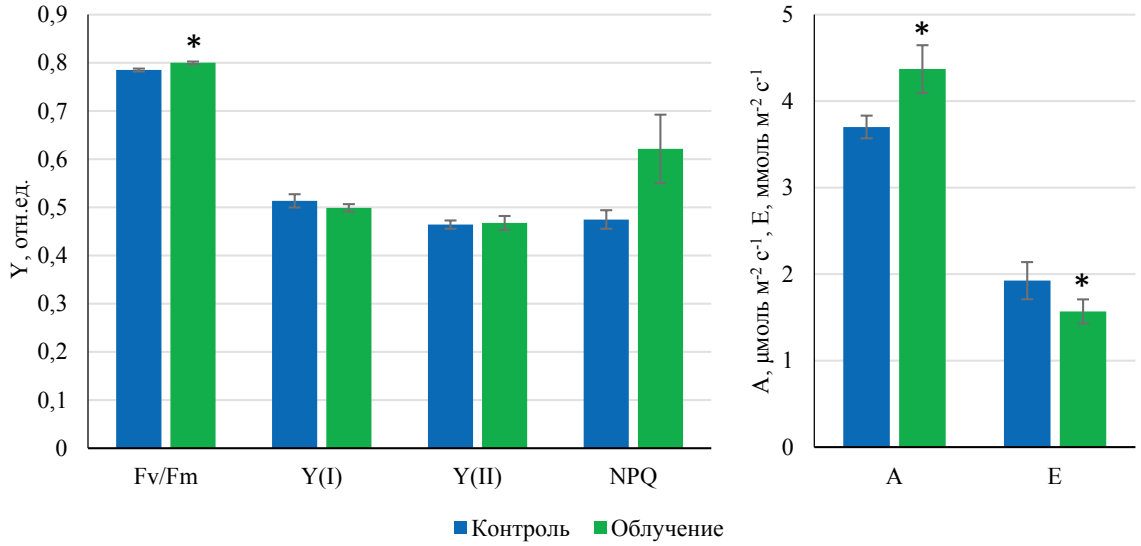


Рисунок 2. Параметры световой (А) и темновой (Б) стадий фотосинтеза у облучённых и контрольных растений. А – ассимиляция, Е – транспирация, Fv/Fm – максимальная эффективность фотосинтеза, Y(I) – квантовый выход фотосистемы I, Y(II) – квантовый выход фотосистемы II, NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции. * – $p<0,05$

Для изучения способности растений, обитающих в условиях повышенного радиационного фона, регулировать фотосинтетические процессы под действием других факторов окружающей среды рассматривалось влияние ИИ на ЭС и интенсивность вызываемых им ответов фотосинтеза. ЭС, индуцированный нагревом листа в кювете с водой, у проростков гороха представлен временной деполяризацией, продолжающейся в течение 30-40 минут. Амплитуда реакции в стебле, как правило, существенно превосходит амплитуду в листьях (рис. 3А). У растений, подвергшихся действию ИИ, обнаружена тенденция к снижению амплитуды ЭС как в стебле, так и в листьях.

ЭС оказывает выраженное воздействие на все основные параметры фотосинтеза. Как правило, интенсивность фотосинтетических ответов хорошо коррелирует с амплитудой ЭС в листе. На рисунке 3 (Б и В) приведены типичные записи ассимиляции, транспирации, квантовых выходов фотосистем и нефотохимического

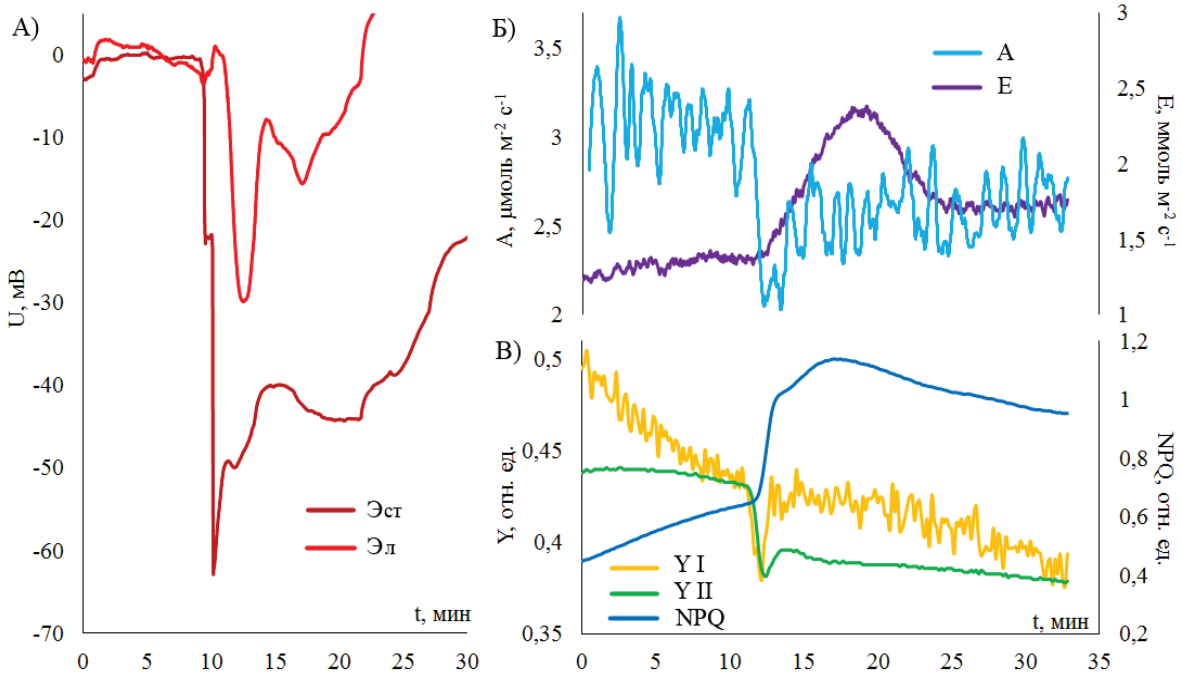


Рисунок 3. Типичные записи поверхностных потенциалов (А), параметров газообмена (Б) и световых параметров фотосинтеза при прохождении ЭС (В); $Э_{ст}$ – потенциал на стебле, $Э_{л}$ – потенциал на листе, А – ассимиляция, Е – транспирация, Y I – квантовый выход фотосистемы 1, Y II – квантовый выход фотосистемы 2, NPQ – нефотохимическое тушение флуоресценции

тушения флуоресценции при прохождении ЭС через исследуемый лист. При этом наблюдается длительное снижение величины ассимиляции и квантового выхода фотосистем и возрастание нефотохимического тушения флуоресценции. Для транспирации наблюдается временное повышение, вскоре сменяющееся спадом. У облучённых растений были выявлены тенденции к снижению амплитуды ответов для всех исследованных параметров фотосинтеза, наиболее выраженные для Y(II) и NPQ. Наиболее вероятной причиной таких различий является снижение амплитуды ЭС у облучённых растений. Полученные результаты также свидетельствуют в пользу того, что под действием ИИ не только модифицируются процессы генерации и распространения электрического сигнала, но и происходит нарушение в их способности осуществлять регуляцию фотосинтетических параметров. На это указывает обнаруженное у облучённых растений исчезновение корреляции между амплитудами электрического сигнала и индуцированного им ответа фотосинтеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хроническое облучение проростков гороха с мощностью дозы на 2 порядка превышающей естественный радиационный фон, оказывает слабое стимулирующее действие на проростки гороха посевного, что можно рассматривать как проявление радиационного гормезиса. Активация процесса фотосинтеза объясняется стимулированием базовых фотосинтетических параметров, главным образом ассимиляции и квантового выхода фотосистемы II. Однако ИИ нарушает дистанционные сигналы растений, в частности, ЭС, влияя как на параметры самого сигнала, так и на вызываемые им функциональные ответы. Потенциально это может приводить к снижению способности растений приспосабливаться к стрессовым факторам среды в зонах радиационного загрязнения.

Список литературы / References:

1. Pozolotina V.N., Antonova E.V. Temporal variability of the quality of *Taraxacum officinale* seed progeny from the East-Ural radioactive trace: is there an interaction between low level radiation and weather conditions? *Int. J. Radiat. Biol.*, 2016, DOI: 10.1080/09553002.2016.1254835.

2. Smith J.T., Willey N.J., Hancock J.T. Low dose ionizing radiation produces too few reactive oxygen species to directly affect antioxidant concentrations in cells. *Biol. Lett*., 2012, vol. 8, pp. 594-597.

3. Кудряшева А.Г. История науки: радиобиология. Действие малых доз ионизирующего излучения. *Вестник ИБ*, 2009, № 2, с. 2-6. [Kudyasheva A.G. The history of science: Radiobiology. The action of low doses of ionizing radiation. *Vestnik IB*, 2009, no. 2, pp. 2-6. (In Russ.)]

4. Зайнуллин В.Г., Евсеева Т.И. Эколого-генетические механизмы реакции биологических систем (от клетки до популяции) на низкоинтенсивные воздействия. *Вестник ИБ*, 2011, № 4-5, с. 29-33. [Zainullin V.G., Evseeva T.I. Ecological and genetic mechanisms of reaction of biological systems (from a cell up to a population) on low-intensive exposure. *Vestnik IB*, 2011, no. 4-5, pp. 29-33. (In Russ.)]

5. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов. *Химическая физика*, 2003, том 22, № 2, с. 21-40. [Burlakova E.B., Konradov A.A., Maltseva E.L. The action of ultra-small doses of biologically active substances and low-intensity physical factors. *Khimicheskaya fizika*, 2003, vol. 22, no. 2, pp. 21-40. (In Russ.)]

6. Петин В.Г., Пронкевич М.Д. *Радиационный гормезис при действии малых доз ионизирующего излучения: Учебное пособие по курсу «Экологическая биофизика»*. Обнинск: ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2012, 73 с. [Petin V.G., Pronkevich M.D. *Radiation hormesis under the action of small doses of ionizing radiation: A manual on the course "Environmental Biophysics"*. Obninsk: IATE MEPHI, 2012, 73 p. (In Russ.)]

7. Кузин А.М. *Структурно-метаболическая теория в радиобиологии.* М.: Наука, 1988, 284 с. [Kuzin A.M. *The structural and metabolic theory in radiobiology.* Moscow: Nauka, 1988, 284 p. (In Russ.)]

8. Kim J.H., Baek M.H., Chung B.Y., Wi S.G., Kim J.S. Alterations in the Photosynthetic Pigments and Antioxidant Machineries of Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Seedlings from Gamma-Irradiated Seeds. *Journal of Plant Biology*, 2004, vol. 47, no. 4. pp. 314-321.

9. Singh B., Ahuja S., Singhal R. K., Venu Babu P. Effect of gamma radiation on wheat plant growth due to impact on gas exchange characteristics and mineral nutrient uptake and utilization. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2012, DOI 10.1007/s10967-012-2342-5.

10. Van Hoeck A., Horemans N., Nauts R., Van Hees M., Vandenhove H., Blust R. *Lemna minor* plants chronically exposed to ionising radiation: RNA-seq analysis indicates a dose rate dependent shift from acclimation to survival strategies. *Plant Science*, 2017, DOI: 10.1016/j.plantsci.2017.01.010.

11. Chandorkar K.R., Clark G.M. Physiological and morphological responses of *Pinus strobus* L. and *Pinus sylvestris* L. seedlings subjected to low-level continuous gamma irradiation at a radioactive waste disposal area. *Environ. Exp. Bot.*, 1986, vol. 26, no. 3, pp. 259-270.

12. Vanhoudt N., Horemans N., Wannijn J., Nauts R., Hees M.V., Vandenhove H. Primary stress responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to gamma radiation. *J. Environ. Radioact.*, 2014, vol. 129, pp. 1-6.

13. Biermans G., Horemans N., Vanhoudt N., Vandenhove H., Saenen E., Hees M. V., Wannijn J., Vangronsveld J., Cuypers A. Biological effects of α-radiation exposure by ^{241}Am in *Arabidopsis thaliana* seedlings are determined both by dose rate and ^{241}Am distribution. *J. Environ. Radioact.,* 2015, vol. 149, pp. 51-63.

14. Fromm J., Lautner S. Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant Cell Environ*, 2007, vol. 30, pp. 249-257.

15. Gallé A., Lautner S., Flexas J., Fromm J. Environmental stimuli and physiological responses: The current view on electrical signaling. *Environ. Exp. Bot.,* 2015, vol. 114, pp.15-21.

16. Stahlberg R., Cleland R., Volkenburgh E. Slow wave potentials – a propagating electrical signal unique to higher plants. In: Baluska F, Mancuso S, Volkmann D (eds) *Communication in plants. Neuronal aspects of plant life*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg, 2006, pp. 291-308.

17. Vodeneev V.A., Katicheva L.A., Sukhov V.S. Electrical Signals in Higher Plants: Mechanisms of Generation and Propagation. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 3, pp. 505-512.

18. Sevriukova O., Kanapeckaite A., Lapeikaite I., Kisnieriene V., Ladygieneb R., Sakalauskasa V. Charophyte electrogenesis as a biomarker for assessing the risk from low-dose ionizing radiation to a single plant cell. *J. Environ. Radioact.*, 2014, vol. 136, pp.10-15.

19. Maxwell K., Johnson G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 2000, vol. 51, pp. 659-668.

20. Klughammer C., Schreiber U. Saturation pulse method for assessment of energy conversion in PS I. *PAM Application Notes*, 2008, vol. 1, pp. 11-14.

EFFECTS OF CHRONIC IRRADIATION IN LOW DOSES ON ELECTROGENESIS AND PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY OF PEA SEEDLINGS

Grinberg M.A., Gromova E.N., Gudkov S.V., Vodeneev V.A.
Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod
Gagarin Ave., 23, Nizhnij Novgorod, 603950, Russia; e-mail: mag1355@yandex.ru

Abstract. The study of the physiological processes of plants and their adaptation to stressors in a permanent high radiation background is significant due to the presence of radiation pollution associated with human activities. The aim of the work is to study the effect of chronic irradiation in a low dose on the electrogenesis and photosynthetic activity of pea seedlings. The object of research is 17-day-old seedlings of peas (*Pisum sativum* L.). The source of ionizing radiation (IR) is a ^{90}Sr-^{90}Y system with an activity of 0.1 MBq. The total accumulated dose was about 12.7 mGy. In the work, measurements of the activity of photosynthesis, the parameters of electrical signals and the photosynthetic responses caused by them were performed. The stimulating effect of IR on the intensity of assimilation (A) and the maximum efficiency of photosynthesis (Fv/Fm) were found at constant values of the quantum yields of photosystems I and II (Y(I) and Y(II)). The amplitude of electrical signals, as well as the intensity of photosynthetic responses caused by them, showed a tendency to decrease.

Key words: *ionizing radiation, low doses, regulation of photosynthesis, electrical signals*

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ ХЛОРОФИЛЛА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ВОДОРОСЛЕЙ

Маторин Д.Н.[1], Братковская Л.Б.[1], Алексеев А.А.[2]
[1] Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
ул. Ленинские горы, г. Москва, 119892, РФ
[2] Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова
г. Якутск, РФ; e-mail: matorin@biophys.msu.ru
Поступила в редакцию: 03.07.2018.

Аннотация. Проанализировано использование флуоресценции хлорофилла для изучения состояния водорослей и природного фитопланктона. Для оценки первичных стадий воздействия на фитопланктон предлагается использование световых и индукционных зависимостей флуоресценции, отражающих изменения в запасании энергии при фотосинтезе.
Ключевые слова: *флуоресценции хлорофилла, водоросли, фитопланктон, фотосинтез, экология.*

Водоросли определяют состояние и продуктивность водных экосистем. При действии различных экологических факторов и антропогенных загрязнений в первую очередь изменяются концентрация и фотосинтетическая активность клеток водорослей [1, 2]. Изменения фитопланктона приводят к изменениям в остальных звеньях водной экосистемы. Поэтому регистрация характеристик фитопланктона может являться способом оценки состояния водной среды в целом. Для быстрой диагностики физиологического состояния культур водорослей и фитопланктона используют различные методы регистрации флуоресценции хлорофилла, которые позволяют получать информацию о количестве и активности фотосинтезирующих организмов [3-10]. По характеристикам состояния фотосинтетического аппарата можно оценивать физиологическое состояние клеток при действии антропогенных факторов и судить о качестве водной среды. Важным преимуществом этих методов является их экспрессность и высокая чувствительность, что позволяет быстро диагностировать состояние объектов непосредственно в среде его обитания «*in situ*». Флуориметры используются для определения состояния культур водорослей при выращивании в разных биотехнологических условиях, при осуществлении мониторинга фитопланктона водоемов, для оценки степени чувствительности природных водорослей к повреждающим факторам среды.

Портативность и автономность приборов позволяет проводить измерения состояния водорослей как в лабораторных колбах и биореакторах, так и в природных условиях [2, 3]. Для выявления чувствительности водорослей к факторам среды необходимо воздействовать на них исследуемым фактором разной напряженности и зарегистрировать по параметрам флуоресценции ответную реакцию клеток на стресс, а также последующие реакции возвращения к норме после снятия стресса. При таких экспериментах можно регулировать дозовые и временные зависимости. Фотосинтетическая активность водорослей и природного фитопланктона зависит от световых условий, температуры и обеспеченности биогенными элементами, в первую очередь – азотом и фосфором. Освещенность и концентрация биогенных элементов в природных водах варьируют в широких пределах и в разных временных шкалах. За периодами высокого содержания в среде биогенных элементов следует снижение их концентрации в результате потребления фитопланктоном. Соответственно, после фазы обеспеченного минеральными веществами активного роста водорослей происходит снижение роста и фотосинтеза.

Современные представления о переносе электрона по фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) предполагают последовательное участие двух фотосистем (ФС II и ФС I), при котором переносчики, восстановленные ФС II, служат донорами электронов для ФС I. Электронный транспорт происходит в фотосинтетических мембранах и сопряжен с образованием электрохимического градиента протонов и синтезом АТФ. Одним из наиболее удобным методом, позволяющим получать информацию о протекании фотосинтетических процессов в интактных объектах в режиме реального времени, является флуоресценция хлорофилла. Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах водорослей, служит своего рода природным датчиком фотосинтетической активности клеток за счет испускания квантов флуоресценции. Измерение соотношения интенсивности флуоресценции при насыщающем фотосинтез свете (Fm) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата (Fo) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов фотосистемы 2 (ФС2), которая равна (Fm-Fo)/Fm=Fv/Fm. Параметр Fv/Fm представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия и не зависящую от видовой специфики организма [9]. Интенсивность флуоресценции F_0 используют для оценки биомассы и скорости роста водорослей, а отношение F_v/F_m для оценки квантового выхода фотосинтеза, который является мерой физиологической активности водорослей. Значение $F_v/F_m > 0,5$ указывает на высокую активность водорослей, а значение $F_v/F_m < 0,5$ свидетельствует о неудовлетворительном состоянии водорослей. На основе флуоресценции на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработана «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом» (ФР.1.39.2011.11246, ПНДФ 14.2.268-2012). Методика допущена для целей государственного экологического контроля по разделу количественный химический анализ вод [3].

В последнее время для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей начинают использовать регистрацию световых кривых фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции, которые проводят на PAM флуориметрах [2, 9]. Измерения световых зависимостей проводится при последовательном увеличении интенсивности от 0 до 1500 мкмоль·м$^{-1}$с$^{-2}$. В конце каждого сеанса освещения при определенной интенсивности с использованием насыщающей вспышки (0,8 с, 3000 мкмоль квантов·м$^{-1}$с$^{-2}$) регистрируются параметры F_M' и выход флуоресценции на свету $F_{(t)}$. На основании измеренных уровней флуоресценции рассчитывали следующие параметры: $F_V/F_M = (F_M - F_O)/F_M$ - максимальный квантовый выход разделения зарядов в ФС II; $Yield = (F_M' - Ft)/F_M'$ - эффективный квантовый выход в ФС II на свету; $NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$ - нефотохимическое тушение флуоресценции и $rETR = Yield \cdot 0{,}5 \cdot E_I$ - относительная скорость электронов по электрон-транспортной цепи, где E_I – освещенность (мкмоль квантов·м$^{-1}$ с$^{-2}$). Из световой кривой (rETR) рассчитывают: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой (α)), максимальную относительную скорость электронов по электрон-транспортной цепи (ETR_{max}) и насыщающую интенсивность света ($E_н = ETR_{max}/\alpha$) [9, 10].

Кроме этого активно развиваются методы измерения индукционных кривых флуоресценции с высоким временным разрешением (от 10 мкс) при возбуждении интенсивным светом [3, 5, 6, 8]. Измерение индукционных кривых флуоресценции с высоким разрешением занимает всего несколько секунд и проводится на приборах типа PAM и PEA. На приборе M-PEA2 появилась возможность наряду с регистрацией флуоресценции измерять изменения поглощения P_{700} (пигмента ФС1). То есть прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями ФС1 и ФС2 [8]. Более того, прибор регистрирует индукционные изменения замедленной флуоресценции, которые дают информацию о кинетике электрохимического градиента протонов на фотосинтетической мембране.

В настоящее время активно развивается космический мониторинг морей и океанов, но он позволяет получать информацию только с поверхности моря. При этом регистрируется температура или цветность моря. Однако важно определять процессы, происходящие в толще воды. Единственными методами, позволяющими следить за живыми организмами в режиме реального времени, являются флуоресценция фитопланктона и биолюминесценция.

Для работ с фитопланктоном в природных условиях разработан ряд устройств для зондирования его флуоресценции. Существуют приборы, в которых флуоресценция возбуждается естественным освещением, однако в большинстве флуориметров применяется искусственное возбуждение постоянным или импульсным освещением. Для контактного зондирования флуоресценции могут быть использованы флуориметры, помещенные на борт судна или лодки, с применением отбора проб или проточных кювет, через которые посредством шланга или помпы непрерывно прокачивается вода, что позволяет осуществлять непрерывную запись флуоресценции. Проточные флуориметры отличаются простотой и надежностью. Однако одним из недостатков проточных флуориметров является некоторое искажение профилей флуоресценции при зондировании за счет протяженности шлангов для подачи воды и трудности привязки отсчетов флуоресценции к значениям глубины.

Использование проточного флуориметра позволяет также проводить измерения содержания хлорофилла фитопланктона приповерхностных вод по ходу судна или вести непрерывный контроль этого показателя в течение длительного времени с платформы. Получаемая информация может быть передана по любым телекоммуникационным каналам в удобной для пользователя форме. В настоящее время некоторыми фирмами выпускается аппаратура для измерения флуоресценции фитопланктона в воде (фирмы TURNER DESIGNS (www.fluorometer.com), BBE Kiel (Германия) (www.bbe-moldaenke.de), Neil Broun (www.neilbroun.com) и некоторые другие).

Для измерения фотосинтетических параметров фитопланктона на кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработан комплекс портативных приборов, включающих бортовой флуориметр, погружной и проточный флуориметры [3, 11]. Малогабаритный импульсный погружной зонд-флуориметр позволяет измерять параметры флуоресценции фитопланктона (Fo, Fv/Fm), температуру и подводную освещенность [11, 13]. Определение величин Fo и Fv/Fm позволяет выявить ситуации, когда в водоемах имеется много фитопланктона (Fo велико), однако, его активность и продукция невелика в силу неблагоприятных условий. На основании этих данных можно получить сравнительную информацию о распределении как самого фитопланктона (Fo), так и его фотосинтетической активности (Fv/Fm) по глубине и горизонтальным разрезам в водоемах и рассчитать фотосинтетическую продукцию с использованием величин подводной освещенности [4].

С помощью этого флуориметра может быть получена информация об экологическом состоянии разных водоемов, построены глубинные разрезы (до 150 м) и трехмерные карты распределения количества и активности фитопланктонных сообществ, температурных и оптических параметров водной среды и выявлены районы, подверженные антропогенному загрязнению. Чрезвычайно важной областью является использование подобной аппаратуры для биомониторинга влияния загрязнений на фитопланктонные популяции в природных водоемах, определения границ этого влияния и качества среды.

Проточный флуорометр также выполняет в автоматическом режиме измерение параметров флуоресценции Fo и Fv/Fm фитопланктона по ходу судна [2, 3]. Для протока воды использовали водоструйный насос, размещенный за измерительной камерой прибора, что обеспечивало нативность клеток водорослей. Скорость протока воды равнялась 0,5 л/мин, время прохождения воды по шлангу до измерительной камеры составляло менее 2 мин. Проточный флуорометр оснащен датчиком GPS для определения и регистрации координат и

времени. Регистрация всех измеренных величин и управление прибором проводили по разработанной нами программе, позволяющей визуализировать и запоминать всю полученную информацию.

Применяя погружной и проточный флуориметры нами было проведено зондирование состояния водной среды в Черном, Каспийском, Средиземном, Норвежском и Южно-Китайском морях, озерах Байкал и Иссык-куль [2, 11-14]. В частности, с использованием разработанного комплекса нами совместно с польскими океанологами было охарактеризовано современное состояние фитоценоза южной части Балтийского моря (район Гданьска). Это позволило построить карты распределения фитопланктона и его активности по акватории и глубине Балтийского моря.

Разработанный комплекс может быть включен основанием для создания системы мониторинга экологического состояния различных прибрежных вод. Такая система позволит контролировать текущее состояние фитопланктонного сообщества, выработать рекомендации по рациональному природопользованию и природно-охранным мероприятиям. Это направление интенсивно развивается в настоящее время и несомненно ему принадлежит большое будущее, поскольку оно обеспечивает раннюю экспресс-диагностику экологического состояния водоемов в режиме реального времени и стыковку космического и наземного зондирования.

Список литературы / References:

1. Falkowski P.G., Raven J.A. *Aquatic photosynthesis*. Malden: Blackwell Science, 1997, 375 p.

2. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. *Флуоресценции хлорофилла высших растений и водорослей*. М., Ижевск: Изд-во ИКИ-РХД, 2012, 256 с. [Matorin D.N., Rubin A.B. *Chlorophyll fluorescence in higher plants and algae*. M.: IKI-RKhD, 2012, 256 p. (In Russ.)]

3. Маторин Д.Н., Осипов В.А., Рубин А.Б. *Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом. Теоретические и практические аспекты.* Учебно-методическое пособие. М.: Альтрекс, 2012, 138 с. [Matorin D.N., Osipov V.A., Rubin, A.B. *Methods for measurement of phytoplankton abundance and indication of its varying state in natural waters by the fluorescent method. theoretical and applied aspects.* M: Al'treks, 2012, 138 p. (In Russ.)]

4. Antal T.K., Venediktov P.S., Matorin D.N., Ostrowska M., Wozniak B., Rubin A.B. Measurement of phytoplankton photosynthesis rate using a pump-and-probe fluorometer. *Oceanologia*, 2001, vol. 43 (3), pp. 291-313.

5. Antal T. K., Matorin D.N., Ilyash L.V., Volgusheva A.A., Osipov V.A., Konyuhov I.V., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Probing of photosynthetic reactions in four phytoplanktonic algae with a PEA fluorometer. *Photosynthesis Res.*, 2009, vol. 102, pp. 67-76.

6. Antal T.K., Osipov V.A., Matorin D.N., Rubin A.B. Membrane potential is involved in regulation of photosynthetic electron transport in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii. Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*, 2011, vol. 102, pp. 169-173.

7. Matorin D.N., Antal T.K., Ostrowska M., Rubin A.B., Ficek D. Chlorophyll fluorometry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae. *Oceanologia*, 2004, vol. 46 (4), pp. 519-531.

8. Oukarroum A., Goltsev V., Strasser R.J. Temperature effects on pea plants probed by simultaneous measurements of the kinetics of prompt fluorescence, delayed fluorescence and modulated 820 nm reflection. *PloS one*, 2013, vol. 8, no. 3, pp. 1-10.

9. Schreiber U. Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: *Chlorophyll fluorescence: A signature of Photosynthesis*. Papageorgiou G. and Govindjee (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 279-319.

10. Herlory O., Richard P. Blanchard G.F. Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. *Mar. Biol.*, 2007, vol. 153, pp. 91-101.

11. Matorin D.N., Venediktov P.S., Konev Yu.V., Rubin A.B. Application of a doublee-flash, impulse, submersible fluorimeter in the determination of photosynthetic activity of natural phytoplankton. *Doklady Russ. Acad. Sci., Earth Sci. Sect*., 1996, vol. 350 (7), pp. 1159-1161.

12. Fadeev V.V., Filippova E.M., Maslov D.V., Matorin D.N. Diagnostics of photosynthesising organisms by linear and non-linear fluorimetry. *Proc. Of SPIE*, 1999, vol. 3821, pp. 248-259.

13. Ostrowska M., Majchrowski R., Matorin D.N. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part1: Theory of classical in situ chlorophyll fluorometry. *Oceanologia*, 2000, vol. 42 (2), pp. 203-219.

14. Ostrowska M., Matorin D.N., Ficek D. Variability of the specific fluorescence of chlorophyll in the ocean. Part 2: fluorometric method of chlorophyll a determination. *Oceanologia*, 2000, vol. 42 (2), pp. 221-229.

FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL FOR ASSESSING THE STATE OF ALGAE

Matorin D.N.[1], Bratkovskaja L.B.[1], Alekseev A.A.[2]
[1] Moscow State University
Vorobyevi Gory, 119892, Moscow, Russia
[2] North-Eastern Federal University
Yakutsk, Russia; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Abstract. The use of fluorescence of chlorophyll for the study of the state of algae and natural phytoplankton has been analyzed. To assess the primary stages of the effect on phytoplankton, it is proposed to use light and inductive fluorescence dependencies that reflect changes in energy storage during photosynthesis.
***Key words**: chlorophyll fluorescence, algae, phytoplankton, photosynthesis, ecology.*

Научный журнал
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И ХИМИИ
Том 3, № 3, 2018

Russian Journal of Biological Physics and Chemistry
Volume 3, No. 3, 2018

Учредитель и издатель:
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»
ул. Университетская, 33. Севастополь, 299053, Российская Федерация

Компьютерная верстка: Д.П. Воронин, И.В. Головченко

Рекомендован к печати Ученым советом
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Адрес редакции:
ул. Университетская, 33, Севастополь, 299053, Российская Федерация
Тел. +7(8692) 43-51-10, e-mail: journal@sevbppc.ru

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ № ФС 77-72655 от 16.04.2018, выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций

Публикуемые материалы прошли процедуру рецензирования и экспертного отбора. Авторы несут ответственность за добросовестность фактов, цитат, имен собственных, географических названий и другой информации. Редакция не несет ответственности за нарушение авторами исключительных прав на результаты интеллектуальной деятельности третьих лиц. Мнение редакции может не совпадать с мнением автора. При перепечатке материалов ссылка на журнал «Акутальные вопросы биологической физики и химии» обязательна.

Формат – 60x84/8. Бумага офсетная. Гарнитура – Times New Roman. Усл. печ. л. – 29,6.
Тираж – 60 экз. Подписано в печать 16.07.2018.

Изготовлено с готового оригинал-макета на полиграфической базе РИИЦ «Медиацентр»
ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»,
ул. Курчатова, 7, Севастополь, 299015, Российская Федерация