

# Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 72, № 2 • 2017 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

## СОДЕРЖАНИЕ

### *Геронтология*

- Забуга О.Г., Вайсерман А.М.* Неполноценное питание в ранней жизни и риск развития диабета 2-го типа: теоретический базис и эпидемиологические доказательства . . . . . 47
- Моргунова Г.В., Клебанов А.А., Маротта Ф., Хохлов А.Н.* pH культуральной среды и “стационарное”/хронологическое старение различных клеток . . . . . 58

### *Гидробиология*

- Кудрявцева В.А., Белевич Т.А., Житина Л.С.* Видовой состав диатомовых водорослей во льду пролива Великая Салма Белого моря перед весенним цветением. . . . . 63

### *Микология и альгология*

- Аветисян Г.А., Аветисян Т.В.* Аномалии ранних стадий развития *Erysiphe graminis tritici* при окислительном стрессе . . . . . 70

### *Молекулярная биология*

- Аргентова В.В., Алиев Т.К., Топорова В.А., Рыбченко В.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.* Изучение влияния эукариотических векторов различных конструкций на экспрессию рекомбинантных антител IgA1-изотипа . . . . . 75
- Новоселецкий В.Н., Вольнцева А.Д., Шайтан К.В., Соколова О.С.* Молекулярное моделирование пространственной структуры тетрамеризационного домена калиевого канала Kv10.2 человека в различных олигомерных состояниях . . . . . 82

### *Физиология растений*

- Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Кушунина М.А.* Влияние дефицита азота на ионообменные свойства полимеров клеточных стенок корней пшеницы . . . . . 87

### *Физиология*

- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А.* Коррекция проявлений экспериментального метаболического синдрома у крыс с помощью некоторых аргининсодержащих пептидов. . . . . 92

### *Цитология*

- Павлова Е.Р., Багров Д.В., Храмова Ю.В., Клинов Д.В., Шайтан К.В.* Деформация ядер кератиноцитов NaCaT на ориентированных волокнистых субстратах . . . . . 99

### *Экология*

- Юзбеков А.К., Замолодчиков Д.Г.* Углекислотный газообмен хвои ели европейской в южнотаёжном ельнике . . . . . 106

## CONTENTS

### **Gerontology**

- Zabuga O.G., Vaiserman A.M.* Malnutrition in early life and risk of type 2 diabetes: theoretical basis and epidemiological evidence . . . . . 47
- Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N.* pH of culture medium and stationary phase/chronological aging of different cells. . . . . 58

### **Hydrobiology**

- Kudryavtseva V.A., Belevich T.A., Zhitina L.S.* Diatoms in the ice of Velikaya Salma straight of the White Sea before the spring algal bloom. . . . . 63

### **Micology and Algology**

- Avetisyan G.A., Avetisyan T.V.* Anomalies of the early stages of development of *Erysiphe graminis tritici* under oxidative stress. . . . . 70

### **Molecular biology**

- Argentova V.V., Aliev T.K., Toporova V.A., Rybchenko V.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* Studies of the influence of different eukaryotic vectors' design on the expression of recombinant antibody IgA1 isotype. . . . . 75
- Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Sokolova O.S.* Molecular modeling of tetramerization domain of human potassium channel Kv10.2 in different oligomeric states. . . . . 82

### **Plant Physiology**

- Meychik N.R., Nikolaeva Yu.I., Kushunina M.A.* Effect of nitrogen deficiency on ion-exchange properties of wheat root cell wall polymers. . . . . 87

### **Physiology**

- Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Myasoedov N.F., Andreeva L.A.* Correction of manifestations of the experimental metabolic syndrome in rats with some arginine-containing peptides . . . . . 92

### **Cytology**

- Pavlova E.R., Bagrov D.V., Khramova Yu.V., Klinov D.V., Shaitan K.V.* Nuclei deformation in HaCaT keratinocytes cultivated on aligned fibrous substrates . . . . . 99

### **Ecology**

- Yuzbekov A.K., Zamolodchikov D.G.* Carbon dioxide exchange in the needles of the common spruce of southern taiga spruce forests. . . . . 106

## ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 616.379–008.64–036.22:616.39

**НЕПОЛНОЦЕННОЕ ПИТАНИЕ В РАННЕЙ ЖИЗНИ И РИСК РАЗВИТИЯ ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА: ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ БАЗИС И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА****О.Г. Забуга, А.М. Вайсерман\***

*ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарёва” НАМНУ,  
Украина, 04114, г. Киев, ул. Вышгородская, д. 67  
\*e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua*

Получены многочисленные экспериментальные и эпидемиологические доказательства того, что недостаточное питание во время раннего развития может влиять на риск развития метаболических патологий во взрослой жизни, включая сахарный диабет 2-го типа (СД2Т). Большая часть эпидемиологических доказательств подобной связи получена в квазиэкспериментальных исследованиях (“естественных экспериментах”), реализованных в популяциях разных стран мира. В этих исследованиях показано, что воздействие голода в течение пренатального и/или раннего постнатального развития связано с повышенным риском развития СД2Т во взрослой жизни. В качестве основного механизма, за счёт которого реализуется связь между воздействием голода в ранней жизни и повышенным риском СД2Т у взрослых людей, рассматривается эпигенетическая регуляция активности генов. Предполагается, что пренатальное воздействие голода может вызывать устойчивые эпигенетические изменения, которые имеют адаптивное значение на протяжении раннего постнатального развития, но предрасполагают к метаболическим нарушениям, включая СД2Т, в дальнейшей жизни. В представленном обзоре обобщены и обсуждены данные квазиэкспериментальных исследований, свидетельствующие о возможности раннего программирования риска СД2Т.

**Ключевые слова:** *сахарный диабет 2-го типа, голод, натуральные эксперименты, квазиэкспериментальные исследования, эпигенетика, обзор*

Сахарный диабет 2-го типа (СД2Т) является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, представляющих серьёзную социальную и экономическую проблему в большинстве современных стран, независимо от уровня их развития. Как известно, данная патология обусловлена возникновением резистентности тканей к инсулину в результате сниженной физической активности и ожирения, которые свойственны многим людям в старости. СД2Т принято считать “диабетом взрослых”, так как обычно он развивается у людей среднего и старшего возраста. Как правило, данное заболевание возникает после 40 лет, хотя в последние годы его всё чаще диагностируют у более молодых пациентов [1]. Быстрый рост распространенности ожирения, возникающего вследствие высококалорийного питания и малоподвижного образа жизни, является ключевой причиной глобальной пандемии СД2Т в последние десятилетия. В настоящее время 415 миллионов человек (около 9% взрослого населения планеты) страдают от этого заболевания. Ожидается, что в течение следующего десятилетия количество больных СД2Т может возрасти до 642 миллионов человек [2]. Ключевую роль в этиологии данной патологии играет генетическая предрасположенность. Однако резкое увеличение частоты

диагностируемого СД2Т во всём мире невозможно объяснить сугубо генетическими факторами, поскольку генетическая структура популяций не может настолько существенно изменяться на протяжении относительно короткого исторического периода. Очевидно, что эти процессы обусловлены прежде всего изменением условий жизни современных людей [3].

Накапливается всё больше экспериментальных и эпидемиологических подтверждений того, что на риск возникновения СД2Т могут оказывать влияние не только факторы окружающей среды (в первую очередь — образ жизни) во взрослом возрасте, но и условия, в которых проходит раннее развитие человека [3]. Явным доказательством этого может служить, например, исследование, осуществленное на семьях индейцев Пима, в которых дети рождались до и после того, как матерям поставили диагноз СД2Т [4]. Полученные данные свидетельствуют о том, что дети, рожденные после того, как их матерям был поставлен диагноз СД2Т, имели в 3,7 раз более высокий риск развития этой патологии по сравнению с детьми, рожденными до возникновения диабета у их матерей, несмотря на то, что они жили в сходных условиях всю оставшуюся жизнь.

В представленном обзоре приведены результаты квазиэкспериментальных исследований (“натуральных экспериментов”), свидетельствующие о том, что склонность к развитию СД2Т во взрослой жизни может определяться неполноценным питанием в период раннего развития человека.

### 1. Пищевое программирование СД2Т в раннем онтогенезе: концептуальный базис

Согласно гипотезе “раннего программирования” потенциала здоровья и склонности к патологии во взрослой жизни (“Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis”), которая за последние десятилетия была подтверждена результатами многих исследований, организм в период развития может адаптироваться к неблагоприятным условиям окружающей среды. Результатом этих адаптаций может стать предрасположенность к различным патологическим состояниям во взрослом возрасте [5]. В частности, неполноценное питание в ранней жизни может приводить к морфологическим и функциональным изменениям в ключевых органах, участвующих в регуляции метаболизма, в том числе и в мозге, печени, жировой ткани, мышцах, поджелудочной железе [6]. В настоящее время такие изменения относят к “прогностическим адаптивным откликам” (“predictive adaptive responses”, PARs) [7]. Воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как неполноценное или несбалансированное питание на стадии внутриутробного развития, может в долгосрочной перспективе “программировать” аппетит и пищевое поведение, а также формирование жировой ткани и дисфункцию бета-клеток поджелудочной железы развивающегося плода [3]. В результате этих процессов развивающийся организм может быть адаптирован к условиям неполноценного питания вследствие снижения продукции инсулина и возникновения инсулинорезистентности.

Согласно гипотезе “экономного фенотипа” (“thrifty phenotype”) [8], такого рода метаболические адаптации после рождения могут обеспечить повышение выживаемости в условиях дефицита пищевых ресурсов вследствие способности генерировать запас жира, который может быть использован во время периодов голодания. Однако подобные метаболические адаптации могут предрасполагать к развитию СД2Т в условиях нормального или, тем более, избыточного питания. При ограничении поступления пищевых ресурсов во время беременности, развитие организма в утробе матери замедляется. Этот процесс называют внутриутробной задержкой роста (ВУЗР). В условиях ВУЗР адаптация плода к недостаточному питанию реализуется с помощью различных механизмов, имеющих отношение к энергетическому обмену и метаболизму глюкозы, а именно: повышение чувствительности к инсулину для утилизации глюкозы, увеличение в печени интенсивности глюконеогенеза, сниже-

ние чувствительности к инсулину в мышцах и нарушение развития поджелудочной железы [9]. Все эти механизмы способствуют выживаемости плода в условиях ВУЗР с помощью оптимизации как продуцирования, так и использования энергии, снижения потребности в аминокислотах и анаболических гормонах, а также стимуляции глюконеогенеза для поддержания уровня глюкозы в жизненно важных органах — прежде всего, в сердце и мозге. Такие адаптивные изменения приводят к асимметричному снижению темпов роста отдельных органов плода, что выражается главным образом в ухудшении развития мышечной массы, подкожной клетчатки и костной ткани [9]. Подобные приспособления позволяют эмбриональным тканям плода в условиях ВУЗР поддерживать энергозависимые функции метаболизма за счёт снижения интенсивности роста в условиях пониженного потребления питательных веществ. Если эти адаптивные изменения сохраняются или индуцируются на более поздних этапах жизни, они могут способствовать чрезмерному потреблению энергии и замедлению обмена веществ в условиях, когда количество питательных веществ увеличивается, способствуя тем самым возникновению резистентности к инсулину, ожирению и СД2Т в зрелом возрасте [9–11].

В ранних исследованиях, посвященных изучению долговременных последствий неполноценного питания в ранней жизни для последующего здоровья человека, в качестве основного показателя, свидетельствующего о ВУЗР, использовали вес при рождении. На основании полученных данных был сделан вывод, что, во-первых, сниженная величина этого показателя является фактором риска развития СД2Т, а во-вторых, существует обратная линейная коррелятивная связь между массой тела при рождении и вероятностью возникновения заболевания во взрослом возрасте [12]. Низкий вес при рождении стали использовать в качестве предиктора не только склонности к СД2Т, но и других ассоциированных с СД2Т патологических состояний в последующей жизни, в том числе нарушений распределения жира [13], липидного профиля, артериального давления и резистентности к инсулину [14], регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [15], а также возникновения ишемической болезни сердца [16]. Более поздние исследования, однако, продемонстрировали, что корреляция между массой тела при рождении и риском развития СД2Т не является линейной, а имеет U-образную форму. Увеличенный вес при рождении (>4000 г) оказался связан с повышенным риском развития данной патологии в той же степени, что и сниженный вес (<2500 г) [17].

На сегодняшний день связь между низким весом при рождении и риском СД2Т в более позднем возрасте изучена наиболее полно. Эта ассоциация в значительной степени связана с так называемым “догоняющим” (“catch-up”) ростом младенцев, чье

внутриутробное развитие происходит в условиях ВУЗР. Догоняющий рост приводит к непропорционально высокой скорости увеличения массы жировой ткани по сравнению с другими тканями [18]. Эти процессы реализуются прежде всего за счёт подавления термогенеза и развития “экономного фенотипа”, характеризующегося резистентностью к инсулину и лептину. У детей, рожденных относительно малыми для своего гестационного возраста, выявлены аномалии в оси гормон роста/инсулиноподобный фактор роста-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1), которые, как известно, играют значительную роль в процессах роста и развития человеческого организма [19]. Подобные аномалии IGF-1 у таких детей, характеризующихся “догоняющим ростом”, как полагают, тесно связаны с метаболическими нарушениями, особенно СД2Т, в более поздней жизни.

Молекулярные механизмы, задействованные в процессе онтогенетического пищевого программирования СД2Т, до сих пор полностью не изучены. Во многих недавних исследованиях получены убедительные доказательства того, что наиболее вероятным механизмом связи между неблагоприятными условиями раннего развития и негативными последствиями для здоровья во взрослой жизни, являются изменения в эпигенетической регуляции экспрессии генов (наследственные изменения функции генов без изменения последовательности входящих в их состав нуклеотидов) [20]. Основными эпигенетическими механизмами являются метилирование ДНК и посттрансляционные модификации гистонов, а также регулирование при помощи некодирующих РНК (микроРНК и макроРНК) [21]. Доказательства в пользу ключевой роли метилирования ДНК и других эпигенетических механизмов в этиологии СД2Т и ожирения получены в большом количестве исследований, осуществленных на различных моделях экспериментальных животных [22]. Так, употребление пищи с высоким содержанием жиров приводило к выраженным изменениям ключевых эпигенетических меток в метаболических тканях. У людей, страдающих ожирением и СД2Т, выявлены эпигенетические изменения ассоциированных с этими патологиями генов.

В концепции “онтогенетического программирования” потенциала здоровья и склонности к патологии во взрослой жизни важным моментом является то, что наиболее интенсивные эпигенетические перестройки происходят в период внутриутробного развития. Эти перестройки необходимы для реализации процессов пролиферации и дифференцировки клеток. На протяжении этого периода эпигеном является наиболее восприимчивым к действию факторов окружающей среды [23].

Результаты многочисленных исследований позволяют предположить, что эпигенетические изменения, индуцированные влиянием определенных факторов среды на стадии развития, могут “им-

принтироваться” и воспроизводиться спустя десятилетия, долгосрочно влияя на метаболические процессы [24]. Эти процессы могут иметь важное значение в этиологии СД2Т. Показано, что существенную роль в патогенезе СД2Т играют изменения уровня экспрессии генов, участвующих в различных нарушениях метаболизма глюкозы, таких как дисфункция  $\beta$ -клеток, нарушение толерантности к глюкозе и инсулинорезистентность [25]. У пациентов с СД2Т в периферической крови и островках Лангерганса выявлены специфические маркеры метилирования ДНК этих генов [26].

## 2. Квазиэкспериментальные исследования раннего программирования сахарного диабета 2-го типа

Многочисленные доказательства зависимости состояния здоровья взрослых людей от условий их раннего развития получены в квазиэкспериментальных исследованиях, например, при изучении долговременных последствий голода в ранней жизни [27]. В следующих разделах рассматриваются эмпирические данные, полученные в исследованиях такого типа, осуществлённых в разных странах.

### 2.1. Голод в Голландии 1944–1945 гг.

На сегодняшний день наиболее полно изучены долгосрочные последствия голода в Голландии 1944–1945 гг. (“Dutch Hunger Winter”). Этот голод, вызванный осуществленным нацистами эмбарго на ввоз продовольствия, был распространён на территории западных Нидерландов с ноября 1944 г. по май 1945 г. В то время как нормальный дневной рацион составляет 2000 ккал для женщин и 2500 ккал для мужчин, на территориях, охваченных голодом в Голландии, средние дневные рационы не превышали 700 ккал на человека [28]. Важно отметить, что до и после этого периода голландская популяция питалась полноценно.

Пренатальное воздействие голода в Голландии привело к долговременным выраженным нарушениям метаболизма, таким как увеличение концентрации липидов в плазме крови и индекса массы тела (ИМТ), а также к повышенному риску ожирения и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в более позднем возрасте (см. обзоры [28–30]). Показано, что выраженность негативных последствий голода в значительной степени зависела от периода, на протяжении которого люди подвергались его воздействию. Наиболее уязвимыми в этом отношении оказались ранние стадии внутриутробного развития [28–31]. Детство и препубертатный возраст также оказались периодами, характеризующимися повышенной чувствительностью, хотя и в несколько меньшей степени.

Повышенный риск заболевания СД2Т выявлен у людей, подвергшихся воздействию голода в Голландии в возрасте до 21 года [32]. У женщин, сообщивших об умеренном уровне голодания в детстве и молодом возрасте, риск СД2Т оказался на 36%

выше, а у тех, которые подверглись воздействию более сильного голода, на 64% выше, чем у женщин, не подвергшихся голоду. Повышенная вероятность развития СД2Т и заболеваний периферических артерий в возрасте 60–76 лет выявлена также у голландских женщин (но не мужчин), которые голодали в возрасте 11–14 лет [33].

В исследованиях, посвященных изучению долговременных последствий голода в Голландии, получены доказательства того, что изменение параметров здоровья сопровождалось выраженными перестройками на эпигенетическом уровне. Хотя и не было обнаружено связи пренатального воздействия голода с уровнем общего метилирования ДНК в зрелом возрасте [34], метилирование отдельных генов оказалось существенно измененным у людей, подвергшихся влиянию голода во время внутриутробного развития. Хэйджманс и др. [31] изучали уровни метилирования импринтированного гена, кодирующего инсулиноподобный фактор роста-2 (Insulin-like growth factor-2, IGF-2), который, как известно, играет важную роль в росте и развитии человека. Этот ген был выбран для анализа, поскольку характеристики его метилирования являются неизменными во взрослом возрасте, в связи с чем *IGF2* является хорошим кандидатом для проведения подобного типа исследования. В данной работе люди, матери которых голодали во время первого триместра беременности, имели значительно более низкие уровни метилирования гена *IGF2* через 60 лет после голода по сравнению с контрольными лицами. В последующем исследовании этих же авторов были изучены характеристики метилирования 15 генов, вовлеченных в развитие метаболических и сердечно-сосудистых нарушений [35]. Уровни метилирования шести из этих генов (*GNASAS*, *IL10*, *LEP*, *ABCA1*, *INSIGF* и *MEG3*) оказались в значительной степени связаны с внутриутробным воздействием голода.

## 2.2. Периоды голода в Австрии на протяжении 20-го века

Данные исследований, посвященных отдаленным последствиям голода в Голландии, были позднее подтверждены результатами изучения популяций других стран, в частности, Австрии. Население этой страны в 20-м веке трижды подверглось голоду: первый из этих периодов явился следствием распада в 1918–1919 гг. Австро-Венгерской империи, второй стал результатом экономического кризиса 1938 г., вызванного неурожаем и продовольственным эмбарго, введенным нацистской Германией, а третий произошел в 1946–1947 гг. после окончания Второй мировой войны. При анализе данных о 325 тыс. больных СД2Т Тернер и соавт. [36] обнаружили, что повышенный риск этого заболевания свойственен тем людям, которые родились в Австрии во время или сразу же после какого-либо из этих эпизодов голода. Например, у тех граждан

Австрии, которые родились в 1919–1921 гг., риск заболеть СД2Т оказался на 40% большим, чем у тех, кто родился в 1918 или 1922 гг. При этом риск возникновения данной патологии был практически неизменным у обитателей регионов, которые были незначительно затронуты голодом. Кроме того, показатели распространенности СД2Т в существенной степени коррелировали с уровнем экономического развития различных областей государства. Авторы исследования сделали вывод, что полученные ими данные свидетельствуют о ключевой роли факторов окружающей среды в период от зачатия до раннего детства в этиологии СД2Т. Среди этих средовых триггеров вклад неполноценного питания, без сомнения, является одним из наибольших, хотя не может быть исключена также роль других факторов, таких, как спровоцированный голодом стресс и инфекционные агенты, в том числе и переносимые грызунами вирусные заболевания [37]. Однако, основываясь на полученных в этом исследовании данных, авторы сделали вывод, что “голодовая гипотеза” является наиболее вероятным объяснением наблюдаемых эффектов [36, 38].

## 2.3. Голод в Украине 1932–1933 гг.

В недавнем исследовании осуществлено изучение ассоциации пренатального воздействия голода с риском СД2Т в большой когорте ( $n = 43150$ ) людей, родившихся в Украине до, во время и после голода 1932–1933 гг. [39]. Как известно, этот голод был результатом коллективизации (принудительного объединения единоличных крестьянских хозяйств в коллективные хозяйства) в начале 1930-х гг., проводимой правительством Советского Союза. Данный процесс привел к гибели нескольких миллионов человек с 10-кратным увеличением уровня смертности в апреле–июле 1933 г. по сравнению с периодами до и после голода.

Риск СД2Т у людей, родившихся в первой половине 1934 г. в регионах, подвергшихся наиболее мощному влиянию голода, оказался на 47% выше, чем у людей, родившихся до и после голода. У тех, кто родился в регионах с умеренно тяжелым уровнем голода, он был на 26% выше, а у тех, кто родился в областях, не затронутых голодом, не был увеличен. Выявленные ассоциации оказались сходными у мужчин и женщин. На основании полученных данных высказано предположение о том, что ранние стадии внутриутробного развития являются критическим периодом, на протяжении которого неполноценное питание приводит к формированию эпигенетических адаптаций, способствующих развитию СД2Т впоследствии.

## 2.4. Блокада Ленинграда 1941–1944 гг.

Блокада Ленинграда (современный Санкт-Петербург) в 1941–1944 гг. спровоцировала голодную смерть миллионов жителей города. Обусловленное осадой голодание привело к снижению массы тела

людей при рождении до 500–600 г [40]. Однако при изучении показателей здоровья у 549 индивидов, рожденных в Ленинграде до или во время блокады, не было выявлено проявлений дислипидемии, нарушений толерантности к глюкозе, гипертонии и повышенного риска ССЗ во взрослом возрасте [41, 42]. Неблагоприятное влияние неполноценного питания во время раннего развития проявлялось у этих людей только в эндотелиальной дисфункции и более выраженной, чем в норме, связью повышенного ИМТ с кровяным давлением. Такие результаты кажутся противоречащими концепции “экономного фенотипа”, так как внутриутробное недоедание не было связано с нечувствительностью к глюкозе во взрослом возрасте. Эти данные не согласуются и с результатами, полученными при изучении голода в Голландии. Возможное объяснение данного противоречия высказано некоторыми авторами, которые предполагают, что исследование долгосрочных последствий блокады Ленинграда осложняется тем, что питание детей, выживших во время блокады, в отличие от ситуации в Голландии, продолжало оставаться неполноценным и в последующие годы [43]. Таким образом, у этих людей не было несоответствия (“mismatch”) между пренатальными и постнатальными условиями развития, что, согласно гипотезе “экономного фенотипа” [8], является определяющим для возникновения неадекватных приспособительных изменений, влияющих на последующий риск развития хронических заболеваний.

В более поздних исследованиях, однако, связь между голоданием в начале жизни во время блокады Ленинграда и риском развития СД2Т во взрослом возрасте была выявлена. Так, у женщин, родившихся в Ленинграде во время блокады, обнаружены рост заболеваемости и снижение возраста манифестации СД2Т без ожирения [44]. Эта группа характеризовалась более высокой частотой метаболических нарушений и их сердечно-сосудистых последствий, таких как артериальная гипертония и атеросклероз коронарных и сонных артерий, а также артерий головного мозга [45]. Сходные проблемы со здоровьем были также продемонстрированы в когортах людей, подвергшихся воздействию голода во время блокады Ленинграда в детстве и в препубертатном периоде. Так, женщины, пережившие голод в возрасте 6–8 лет, и мужчины, пережившие голод в возрасте 9–15 лет, характеризовались повышением систолического артериального давления во взрослой жизни по сравнению с контрольными (не голодавшими во время блокады) жителями того же региона. Кроме того, женщины и мужчины, пострадавшие от голода в возрасте 6–8 и 9–15 лет соответственно, характеризовались повышенной смертностью от ишемической болезни сердца и цереброваскулярных заболеваний [46].

### 2.5. Голод в Китае 1959–1961 гг.

Наиболее активно в настоящее время изучаются долгосрочные последствия голода в Китае (“Great Leap Forward Famine”) в 1959–1961 гг. Этот широкомасштабный голод охватил значительную часть территории Китая в конце 1950-х гг. после радикальной реформы сельского хозяйства, обычно именуемой “Большим скачком”. Голод привел к смерти 25–30 миллионов человек и уменьшению рождаемости на 30–35 миллионов [47]. Нужно отметить, что в работах, посвященных изучению долгосрочных последствий “Великого китайского голода” есть методологическое ограничение, связанное с невозможностью определения точного периода воздействия голода. Эта особенность отличает исследования в Китае от аналогичных, проводимых в Голландии и Украине.

Одним из наиболее очевидных результатов при изучении долговременных последствий голода в Китае является выраженное увеличение распространенности СД2Т и связанных с ним нарушений обмена веществ у людей, родившихся в период голода по сравнению с людьми, рожденными после голода [48]. В частности, 3,9-кратное повышение риска гипергликемии выявлено у жителей наиболее пострадавших от голода областей, чьи матери неполноценно питались на протяжении их внутриутробного развития, по сравнению с людьми, не пострадавшими от голода. Подобные различия не были выражены в менее пострадавших регионах. Примечательно, что риск гипергликемии был в 7,6 раз выше у пострадавших от голода жителей Китая, которые перешли в ходе жизни на диету западного типа, и в 6,2 раза выше у тех, которые во взрослом возрасте имели более высокий экономический статус, чем у людей, не подвергшихся воздействию голода [49]. Несколько позднее в исследовании Ванг и соавт. [50] было показано, что воздействие голода как на протяжении пренатального развития, так и в детстве приводит к более высокому риску возникновения СД2Т в зрелом возрасте (в 1,5 и 1,8 раза соответственно), чем у людей из контрольной группы. У подвергшихся голоду лиц, проживающих в регионах Китая с высоким уровнем экономического развития, выявлен на 47% более высокий риск развития СД2Т, чем у жителей экономически менее развитых регионов. Наиболее выраженная связь между голодом во время раннего развития и риском СД2Т у взрослых выявлена при изучении мужчин, пострадавших от неполноценного питания внутриутробно, а также женщин, подвергшихся голоду в детстве. Выраженная зависимость распространенности СД2Т в отдельных регионах Китая от интенсивности голода во время раннего развития выявлена и в последующем исследовании тех же авторов [51]. Лица, подвергшиеся воздействию сильного голода на стадии внутриутробного развития и в детстве, имели значительно более высокие риски СД2Т (1,90 и 1,44 соответ-

ственно), чем те, которые проживали на территории менее пострадавших регионов. В 1,44 раза более высокий риск СД2Т был выявлен у людей, подвергшихся воздействию голода в период среднего детства, а также в 1,5 раза более высокий риск гипергликемии – у тех, которые пострадали от голода как в среднем, так и в позднем детстве [52]. Примечательно, что те лица, которые испытали более сильный голод в детстве, имели на 38% более высокий риск СД2Т, чем те, кто подвергся менее суровому голоду. Интересно, что подобная связь была выявлена только у женщин, но не у мужчин. Подобного рода гендерные различия наблюдались и для риска развития гипергликемии.

В недавнем исследовании получены свидетельства того, что эффекты программирования СД2Т могут не только возникать в результате внутриутробного воздействия голода (то есть в поколении F1), но и передаваться поколению F2 [53]. Так, воздействие голода на развивающийся плод привело к 1,75-кратному повышению риска СД2Т и 1,93-кратному – гипергликемии во взрослом возрасте в поколении F1. При этом потомки поколения F2 имели повышенный в 2,02 раза риск развития гипергликемии во взрослом возрасте по сравнению с потомками не подвергавшимися воздействию голода людей. Эти данные свидетельствуют о том, что эффекты, индуцированные неполноценным питанием во время раннего развития, могут передаваться трансгенерационно (посредством зародышевой линии) в ряду поколений, приводя к повышенной склонности к СД2Т у потомков подвергшихся воздействию голода лиц.

### 2.6. Голод в Нигерии 1967–1970 гг.

Голод в Нигерии (“Biafran Famine”) явился следствием гражданской войны, охватившей эту страну в 1967–1970 гг. Из 1–3 миллионов жертв войны только около 10% погибли непосредственно от военных действий, а подавляющее большинство умерло от голода [54]. Хульт и др. [55] изучили риски возникновения гипертензии, избыточного веса и нарушения толерантности к глюкозе по истечении сорока лет после пренатального воздействия голода. Изученная когорта (n = 1339) состояла из взрослых лиц, родившихся до (1965–1967), во время (1968–1970), или после (1971–1973) периода голода. Воздействие голода на протяжении пренатального и постнатального периодов развития оказалось в значительной степени ассоциировано с выраженным повышением систолического и диастолического артериального давления, уровня глюкозы в крови и с увеличением обхвата талии во взрослом возрасте. Кроме того, людям, подвергнутым голоду во время раннего развития, были свойственны существенно повышенный риск систолической гипертензии, нарушенная толерантность к глюкозе и избыточная масса тела по сравнению с лицами, которые родились после голода.

### 2.7. Холокост 1939–1945 гг.

Как известно, во время Холокоста было уничтожено около шести миллионов евреев. Этот период сопровождался голодом и хроническим стрессом подвергнутого преследованию населения разных стран Европы. В недавнем исследовании при помощи анкет самооценки здоровья осуществлено определение параметров, характеризующих статус здоровья и склонность к хроническим заболеваниям у 70 евреев, родившихся в странах, подконтрольных нацистам в период 1940–1945 гг., а также 230 соответствующих по возрасту и полу лиц, родившихся в Израиле (контрольная группа) [56]. Пострадавшие от голода в период Холокоста лица имели повышенный риск метаболических нарушений, в том числе высокие значения ИМТ, 1,46-кратное увеличение риска гипертензии, 1,58-кратное – дислипидемии, и 1,89-кратное – СД2Т по сравнению с контрольной группой. Выявленные ассоциации были впоследствии подтверждены в исследовании, включавшем большие группы участников (пострадавшие: n = 653; не пострадавшие: n = 433) [57]. У пострадавших во время Холокоста лиц выявлено существенное повышение риска гипертензии, СД2Т, метаболического синдрома и сосудистых заболеваний.

### 3. Сезонность рождения

Сезон рождения может быть использован в квазиэкспериментальных исследованиях при изучении связи между воздействиями в ранней жизни (в том числе и пищевыми) и показателями здоровья в более позднем возрасте. В качестве удобного для сопоставления индекса в подобных исследованиях часто используют месяц рождения людей. Оправданность применения подобного подхода связана с тем, что на протяжении первой половины прошлого века, когда родилось большинство людей, включаемых в подобные исследования, существовали выраженные сезонные колебания в доступности основных важных компонентов питания, особенно в развивающихся странах [58]. Сезонные колебания присущи и другим факторам, потенциально вовлеченным в процессы раннего программирования СД2Т. К числу этих факторов относятся температура [59], инфекции [60], длина светового дня и, соответственно, синтез мелатонина и витамина D [61], а также физическая активность матери [62] и употребление ею алкоголя [63]. Продемонстрировано, что связанные с сезоном года условия в значительной степени влияют на некоторые жизненно важные показатели, в том числе вес людей при рождении. В регионах высокой и низкой широты дети, родившиеся зимой, имеют сниженный вес по сравнению с детьми, родившимися летом. В средних широтах, наоборот, дети, родившиеся летом, характеризуются сниженной массой тела [64].

Во многих исследованиях важная роль сезонности рождения выявлена для различных аспектов

метаболического синдрома, включая высокое систолическое артериальное давление [65], ожирение [66, 67], а также дислипидемию, инсулинорезистентность и ССЗ [68]. Роль сезонности рождения неоднократно показана для аутоиммунного сахарного диабета 1-го типа [69]. Для СД2Т до последнего времени влияние сезонности рождения было отмечено лишь в нескольких исследованиях, осуществлённых на небольших выборках, в том числе в работах, проведенных на 155 афроамериканских подростках в США [70] и на 282 взрослых людях в Нидерландах [71].

Наиболее очевидные доказательства роли сезонных факторов во время раннего развития в этиологии СД2Т получены в недавнем исследовании, реализованном на популяции Украины [72]. В нем было показано, что те лица, которые родились в апреле и мае, имеют повышенный риск развития СД2Т. Большая часть внутриутробного развития этих людей в странах умеренного климата, к которым относится и Украина, проходит в условиях частичного дефицита определенных пищевых компонентов — с поздней осени до ранней весны, а первые месяцы после рождения — в условиях относительно богатого пищевыми ресурсами теплого сезона года. У людей, рожденных в ноябре и декабре, внутриутробное развитие которых приходилось на благополучные в пищевом отношении месяцы года, а младенчество — на период относительного дефицита пищевых компонентов (зима-весна), напротив, наблюдалось снижение риска СД2Т во взрослой жизни. Эти данные хорошо согласуются с гипотезой “экономного фенотипа” [8]. Обнаруженная сезонность рождения оказалась сходной у больных сахарным диабетом 1-го и 2-го типа, что свидетельствует о возможной роли одних и тех же факторов окружающей среды в этиологии обеих этих патологий [73].

В недавнем исследовании, осуществленном в Дании, доказательств связи сезона рождения с последующим риском развития СД2Т обнаружено не было [74]. Авторы предположили, что разницу в эффектах, выявленных в Дании и Украине, можно объяснить прежде всего различиями в уровне экономического развития этих стран. Действительно, сезонные колебания климатических условий и режима питания на протяжении исследованного периода были намного более выраженными в Украине, чем в более развитой экономически Дании.

Одним из возможных объяснений сезонного программирования заболеваний взрослого возраста является индукция устойчивых эпигенетических изменений, имеющих адаптивное значение во время раннего постнатального развития, но предрасполагающих к развитию хронических заболеваний, в том числе и метаболического синдрома, на более поздних этапах жизни. Доказательства индукции таких изменений получены в недавнем широкомасштабном исследовании эпигенома (EWAS), осуществлен-

ном Локетом и соавт. [75]. В этой работе выявлены зависящие от сезона рождения изменения метилирования 92 CpG-динуклеотидов. Большинство этих дифференциально метилированных сайтов были выявлены в генах, имеющих отношение к регуляции клеточного цикла, развития и апоптоза. Примечательно, что ассоциированные с сезоном рождения модели метилирования отсутствовали у новорожденных. Это дает основания предположить, что они возникают на более поздних этапах развития организма. В более позднем исследовании Дугуэ и соавт. [76] не смогли подтвердить эти результаты, хотя авторы также предположили, что изменения в метилировании ДНК могут опосредовать влияние сезона рождения на риск заболеваний в дальнейшей жизни.

#### 4. Выводы и перспективы дальнейших исследований

В последние годы тенденция к резкому повышению заболеваемости СД2Т стала серьёзной проблемой во всем мире. Метаболический синдром и связанные с ним факторы риска, включая дислипидемию, повышенное кровяное давление, нарушения метаболизма глюкозы и СД2Т, относятся к ведущим причинам смертности как в развитых, так и в развивающихся странах. Распространено мнение, что риск данной патологии зависит, в основном, от генетической предрасположенности и образа жизни. Тем не менее, генетические факторы, несомненно, определяющие индивидуальную восприимчивость к развитию ожирения и СД2Т, могут объяснить существующую тенденцию к резкому росту распространенности СД2Т лишь частично [22, 77].

В ряде недавних исследований показано, что неполноценное питание и стрессы в начале жизни являются важными факторами, определяющими риск СД2Т и связанных с ним нарушений во взрослом возрасте. Результаты некоторых работ свидетельствуют о том, что развитие этих патологических состояний в значительной степени зависит от эпигенетической регуляции экспрессии генов. Известно, что индуцированные стрессами на протяжении ранних стадий развития эпигенетические изменения могут сохраняться долгосрочно, оказывая влияние на различные фенотипические характеристики организма. Подобное “эпигенетическое программирование” может долгосрочно влиять на метаболические функции, и, при наличии генетической предрасположенности, приводить к СД2Т на поздних этапах жизни [78].

Особенности питания на протяжении пренатального и постнатального периодов развития являются, безусловно, ключевым фактором, влияющим на риск СД2Т и других проявлений метаболического синдрома у взрослых людей. Доказательства связи между неполноценным питанием в ранней

жизни и метаболическими нарушениями у взрослых людей выявлены во многих исследованиях. Например, показана связь между неполноценным пренатальным питанием во время голода в Голландии и факторами риска СД2Т, такими как нарушенная толерантность к глюкозе, атерогенный липидный профиль и ожирение во взрослом возрасте [28–30]. Кроме того, у потомков, рождённых от матерей, голодавших во время беременности, выявлены изменённые характеристики метилирования генов, включая те, которые связаны с патогенезом СД2Т [31, 35]. Эти данные указывают на важность эпигенетических процессов в качестве посредни-

ков между воздействием голода во время раннего развития и риском метаболической патологии в последующей жизни. Результаты этих исследований свидетельствуют о том, что акцент на очень ранних сроках беременности, возможно, даже на прекоцепционном периоде, может стать важным фактором профилактики СД2Т [79]. Кроме того, поскольку эпигенетические изменения, в отличие от генетических, являются потенциально обратимыми [80], использование препаратов, позволяющих модифицировать эпигеном, может обеспечить новый подход к профилактике и лечению СД2Т и связанных с ним нарушений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wilmot E., Idris I.* Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and management // *Ther. Adv. Chronic. Dis.* 2014. Vol. 5. N 6. P. 234–244.
2. *Jaacks L.M., Siegel K.R., Gujral U.P., Narayan K.M.* Type 2 diabetes: A 21st century epidemic // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016. Vol. 30. N 3. P. 331–343.
3. *Nielsen J.H., Haase T.N., Jaksch C., et al.* Impact of fetal and neonatal environment on beta cell function and development of diabetes // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2014. Vol. 93. N 11. P. 1109–1122.
4. *Dabelea D., Hanson R.L., Lindsay R.S., Pettitt D.J., Imperatore G., Gabir M.M., Roumain J., Bennett P.H., Knowler W.C.* Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships // *Diabetes.* 2000. Vol. 49. N 12. P. 2208–2211.
5. *Eriksson J.G.* Developmental origins of health and disease – from a small body size at birth to epigenetics // *Ann. Med.* 2016. Vol. 48. N 6. P. 456–467.
6. *Kim J.B.* Dynamic cross talk between metabolic organs in obesity and metabolic diseases // *Exp. Mol. Med.* 2016. Vol. 48. N 3. e214.
7. *Nettle D., Bateson M.* Adaptive developmental plasticity: what is it, how can we recognize it and when can it evolve? // *Proc. Biol. Sci.* 2015. Vol. 282. N 1812. Article ID 20151005.
8. *Hales C.N., Barker D.J.* Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992 // *Int. J. Epidemiol.* 2013. Vol. 42. N 5. P. 1215–1222.
9. *Thorn S.R., Rozance P.J., Brown L.D., Hay W.W. Jr.* The intrauterine growth restriction phenotype: fetal adaptations and potential implications for later life insulin resistance and diabetes // *Semin. Reprod. Med.* 2011. Vol. 29. N 3. P. 225–236.
10. *Carolan-Olah M., Duarte-Gardea M., Lechuga J.* A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease // *J. Clin. Nurs.* 2015. Vol. 24. N 23–24. P. 3716–3729.
11. *Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E.* Nutrition in early life and age-associated diseases // *Ageing Res. Rev.* 2016. pii: S1568-1637(16)30179-9.
12. *Whincup P.H., Kaye S.J., Owen C.G., et al.* Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review // *J. Am. Med. Assoc.* 2008. Vol. 300. N 24. P. 2886–2897.
13. *Kensara O.A., Wootton S.A., Phillips D.I., Patel M., Jackson A.A., Elia M.* Hertfordshire Study Group. Fetal programming of body composition: Relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen // *Am. J. Clin. Nutr.* 2005. Vol. 82. N 5. P. 980–987.
14. *Morrison K.M., Ramsingh L., Gunn E., Streiner D., Van Lieshout R., Boyle M., Gerstein H., Schmidt L., Saigal S.* Cardiometabolic health in adults born premature with extremely low birth weight // *Pediatrics.* 2016. Vol. 138. N 4. e20160515.
15. *Stirrat L.I., Reynolds R.M.* The effect of fetal growth and nutrient stresses on steroid pathways // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2016. Vol. 160. P. 214–220.
16. *Frankel S., Elwood P., Sweetnam P., Yarnell J., Smith G.D.* Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease // *Lancet.* 1996. Vol. 348. N 9040. P. 1478–1480.
17. *Harder T., Rodekamp E., Schellong K., Dudenhausen J.W., Plagemann A.* Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: a meta-analysis // *Am. J. Epidemiol.* 2007. Vol. 165. N 8. P. 849–857.
18. *Dulloo A.G.* Thrifty energy metabolism in catch-up growth trajectories to insulin and leptin resistance // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 22. N 1. P. 155–171.
19. *Cho W.K., Suh B.K.* Catch-up growth and catch-up fat in children born small for gestational age // *Korean J. Pediatr.* 2016. Vol. 59. N 1. P. 1–7.
20. *Ong T.P., Ozanne S.E.* Developmental programming of type 2 diabetes: early nutrition and epigenetic mechanisms // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2015. Vol. 18. N 4. P. 354–360.
21. *Paluch B.E., Naqash A.R., Brumberger Z., Nemeth M.J., Griffiths E.A.* Epigenetics: A primer for clinicians // *Blood Rev.* 2016. Vol. 30. N 4. P. 285–295.
22. *van Dijk S.J., Tellam R.L., Morrison J.L., Muhlhausler B.S., Molloy P.L.* Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease // *Clin. Epigenetics.* 2015. Vol. 7. P. 66.
23. *Vaiserman A.* Epidemiologic evidence for association between adverse environmental exposures in early life and epigenetic variation: a potential link to disease susceptibility? // *Clin. Epigenetics.* 2015. Vol. 7. P. 96.
24. *Geraghty A.A., Lindsay K.L., Alberdi G., McAuliffe F.M., Gibney E.R.* Nutrition during pregnancy impacts offspring's epigenetic status – evidence from human and animal studies // *Nutr. Metab. Insights.* 2016. Vol. 8. N 1. P. 41–47.
25. *Alam F., Islam M.A., Gan S.H., Mohamed M., Sasonko T.H.* DNA methylation: an epigenetic insight into

- type 2 diabetes mellitus // *Curr. Pharm. Des.* 2016. Vol. 22. N 28. P. 4398–4419.
26. Kwak S.H., Park K.S. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes // *Exp. Mol. Med.* 2016. Vol. 48. N 3. e220.
27. Porta M., ed. A dictionary of epidemiology (5th Edition). NY: Oxford Univ. Press, 2008. 320 p.
28. Heijmans B.T., Tobi E.W., Lumey L.H., Slagboom P.E. The epigenome: archive of the prenatal environment // *Epi-genetics.* 2009. Vol. 4. N 8. P. 526–531.
29. Lumey L.H., Stein A.D., Susser E. Prenatal famine and adult health // *Annu. Rev. Public Health.* 2011. Vol. 32. P. 237–262.
30. Roseboom T.J., Painter R.C., van Abeelen A.F., Veenendaal M.V., de Rooij S.R. Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine // *Maturitas.* 2011. Vol. 70. N 2. P. 141–145.
31. Heijmans B.T., Tobi E.W., Stein A.D., Putter H., Blauw G.J., Susser E.S., Slagboom, P.E., Lumey L.H. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans // *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105. N 44. P. 17046–17049.
32. van Abeelen A.F., Elias S.G., Bossuyt P.M., Grobbee D.E., van der Schouw Y.T., Roseboom T.J., Uiterwaal C.S. Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood // *Diabetes.* 2012. Vol. 61. N 9. P. 2255–2260.
33. Portrait F., Teeuwiszen E., Deeg D. Early life under-nutrition and chronic diseases at older ages: the effects of the Dutch famine on cardiovascular diseases and diabetes // *Soc. Sci. Med.* 2011. Vol. 73. N 5. P. 711–718.
34. Lumey L.H., Terry M.B., Delgado-Cruzata L., Liao Y., Wang Q., Susser E., McKeague I., Santella R.M. Adult global DNA methylation in relation to pre-natal nutrition // *Int. J. Epidemiol.* 2012. Vol. 41. N 1. P. 116–123.
35. Tobi E.W., Lumey L.H., Talens R.P., Kremer D., Putter H., Stein A.D., Slagboom P.E., Heijmans B.T. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific // *Hum. Mol. Genet.* 2009. Vol. 18. N 21. P. 4046–4053.
36. Thurner S., Klimek P., Szell M., Duftschmid G., Endel G., Kautzky-Willer A., Kasper D.C. Quantification of excess risk for diabetes for those born in times of hunger, in an entire population of a nation, across a century // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110. N 12. P. 4703–4707.
37. Klitz W., Niklasson B. Viral underpinning to the Austrian record of type 2 diabetes? // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110. N 30. P. E2750–E2750.
38. Thurner S., Klimek P., Szell M., Duftschmid G., Endel G., Kautzky-Willer A., Kasper D.C. Reply to Klitz and Niklasson: Can viral infections explain the cross-sectional Austrian diabetes data? // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110. N 30. E2751.
39. Lumey L.H., Khalangot M.D., Vaiserman A.M. Association between type 2 diabetes and prenatal exposure to the Ukraine famine of 1932–33: a retrospective cohort study // *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015. Vol. 3. N 10. P. 787–794.
40. Sparén P., Vågerö D., Shestov D.B., Plavinskaja S., Parfenova N., Hoptiar V., Paturot D., Galanti M.R. Long term mortality after severe starvation during the siege of Leningrad: prospective cohort study // *Brit. Med. J.* 2004. Vol. 328. N 7430. P. 11.
41. Stanner S.A., Bulmer K., Andrès C., Lantseva O.E., Borodina V., Poteen V.V., Yudkin J.S. Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study // *Brit. Med. J.* 1997. Vol. 315. N 7119. P. 1342–1348.
42. Stanner S.A., Yudkin J.S. Fetal programming and the Leningrad Siege study // *Twin Res.* 2001. Vol. 4. N 5. P. 287–292.
43. Bateson P. Fetal experience and good adult design // *Int. J. Epidemiol.* 2001. Vol. 30. N 5. P. 928–934.
44. Khoroshinina L.P., Zhavoronkova N.V. Starving in childhood and diabetes mellitus in elderly age // *Adv. Gerontol.* 2008. Vol. 21. N 4. P. 684–687.
45. Khoroshinina L.P. Peculiarities of somatic diseases in people of middle and old age survived Leningrad siege at childhood // *Adv. Gerontol.* 2004. Vol. 14. P. 55–65.
46. Koupil I., Shestov D.B., Sparén P., Plavinskaja S., Parfenova N., Vågerö D. Blood pressure, hypertension and mortality from circulatory disease in men and women who survived the siege of Leningrad // *Eur. J. Epidemiol.* 2007. Vol. 22. N 4. P. 223–234.
47. Jowett A.J. The demographic responses to famine: the case of China 1958–61 // *GeoJournal.* 1991. Vol. 23. N 2. P. 135–146.
48. Li C., Lumey L.H. Exposure to the Chinese famine of 1959–61 in early life and current health conditions: a systematic review and meta-analysis // *Lancet.* 2016. Vol. 388. N 1. P. S63.
49. Li Y., He Y., Qi L., Jaddoe V.W., Feskens E.J., Yang X., Ma G., Hu F.B. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood // *Diabetes.* 2010. Vol. 59. N 10. P. 2400–2406.
50. Wang N., Wang X., Han B., Li Q., Chen Y., Zhu C., Chen Y., Xia F., Cang Z., Zhu C., et al. Is exposure to famine in childhood and economic development in adulthood associated with diabetes? // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. Vol. 100. N 12. P. 4514–4523.
51. Wang N., Cheng J., Han B., Li Q., Chen Y., Xia F., Jiang B., Jensen M.D., Lu Y. Exposure to severe famine in the prenatal or postnatal period and the development of diabetes in adulthood: an observational study // *Diabetologia.* 2017. Vol. 60. N 2. P. 262–269.
52. Wang J., Li Y., Han X., et al. Exposure to the Chinese Famine in childhood increases type 2 diabetes risk in adults // *J. Nutr.* 2016. Vol. 146. N 11. P. 2289–2295.
53. Li J., Liu S., Li S., et al. Prenatal exposure to famine and the development of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood across consecutive generations: a population-based cohort study of families in Suihua, China // *Am. J. Clin. Nutr.* 2017. Vol. 105. N 1. P. 221–227.
54. Miller J.P. Medical relief in the Nigerian civil war // *Lancet.* 1970. Vol. 760. N 1. P. 1330–1334.
55. Hult M., Tornhammar P., Ueda P., Chima C., Bonamy A.K., Ozumba B., Norman M. Hypertension, diabetes and overweight: looming legacies of the Biafran famine // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. N 10. e13582.
56. Bercovich E., Keinan-Boker L., Shasha S.M. Long-term health effects in adults born during the Holocaust // *Isr. Med. Assoc. J.* 2014. Vol. 16. N 4. P. 203–207.
57. Keinan-Boker L., Shasha-Lavsky H., Eilat-Zanani S., Edri-Shur A., Shasha S.M. Chronic health conditions in Jewish Holocaust survivors born during World War II // *Isr. Med. Assoc. J.* 2015. Vol. 17. N 4. P. 206–212.
58. Watson P.E., McDonald B.W. Seasonal variation of nutrient intake in pregnancy: effects on infant measures and possible influence on diseases related to season of birth // *Eur. J. Clin Nutr.* 2007. Vol. 61. N 11. P. 1271–1280.

59. Flouris A.D., Spiropoulos Y., Sakellariou G.J., Koutedakis Y. Effect of seasonal programming on fetal development and longevity: links with environmental temperature // *Am. J. Hum. Biol.* 2009. Vol. 21. N 2. P. 214–216.
60. Finch C.E., Crimmins E.M. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans // *Science*. 2004. Vol. 305. N 5691. P. 1736–1739.
61. Lowell W.E., Davis G.E. Jr. The light of life: evidence that the sun modulates human lifespan // *Med. Hypotheses*. 2008. Vol. 70. N 3. P. 501–507.
62. Smith A.D., Crippa A., Woodcoc, J., Brage S. Physical activity and incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies // *Diabetologia*. 2016. Vol. 59. N 12. P. 2527–2545.
63. Vaiserman A.M. Early-life exposure to substance abuse and risk of type 2 diabetes in adulthood // *Curr. Diab. Rep.* 2015. Vol. 15. N 8. Article 48.
64. Chodick G., Flash S., Deoitch Y., Shalev V. Seasonality in birth weight: review of global patterns and potential causes // *Hum. Biol.* 2009. Vol. 81. N 4. P. 463–477.
65. Banegas J.R., Rodríguez-Artalejo F., de la Cruz J.J., Graciani A., Villar F., del Rey-Calero J. Adult men born in spring have lower blood pressure // *J. Hypertens.* 2000. Vol. 18. N 12. P. 1763–1766.
66. Phillips D.I., Young J.B. Birth weight, climate at birth and the risk of obesity in adult life // *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000. Vol. 24. N 3. P. 281–287.
67. Wattie N., Ardern C.I., Baker J. Season of birth and prevalence of overweight and obesity in Canada // *Early Hum. Dev.* 2008. Vol. 84. N 8. P. 539–547.
68. Lawlor D.A., Davey-Smith G., Mitchell R., Ebrahim S. Temperature at birth, coronary heart disease, and insulin resistance: cross sectional analyses of the British women's heart and health study // *Heart*. 2004. Vol. 90. N 4. P. 381–388.
69. Laron Z., Lewy H., Wilderman I., Casu A., Willis J., Redondo M.J., Libman I., White N., Craig M. Seasonality of month of birth of children and adolescents with type 1 diabetes mellitus in homogenous and heterogeneous populations // *Isr. Med. Assoc. J.* 2005. Vol. 7. N 6. P. 381–384.
70. Grover V., Lipton R.B., Sclove S.L. Seasonality of month of birth among African American children with diabetes mellitus in the City of Chicago // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2004. Vol. 17. N 3. P. 289–296.
71. Jongbloet P.H., van Soestbergen M., van der Veen E.A. Month-of-birth distribution of diabetics and ovopathy: a new aetiological view // *Diabetes Res.* 1988. Vol. 9. N 2. P. 51–58.
72. Vaiserman A.M., Khalangot M.D., Carstensen B., Tronko M.D., Kravchenko V.I., Voitenko V.P., Mechova L.V., Koshel N.M., Grigoriev P.E. Seasonality of birth in adult type 2 diabetic patients in three Ukrainian regions // *Diabetologia*. 2009. Vol. 52. N 12. P. 2665–2667.
73. Vaiserman A.M., Khalangot M.D. Similar seasonality of birth in type 1 and type 2 diabetes patients: A sign for common etiology? // *Med. Hypotheses*. 2008. Vol. 71. N 4. P. 604–605.
74. Jensen C.B., Zimmermann E., Gamborg M., Heitmann B.L., Baker J.L., Vaag A., Srensen T.I. No evidence of seasonality of birth in adult type 2 diabetes in Denmark // *Diabetologia*. 2015. Vol. 58. N 9. P. 2045–2050.
75. Lockett G.A., Soto-Ram rez N., Ray M.A., Everson T.M., Xu C.J., Patil V.K., Terry, W., Kaushal A., Rezwan F.I., Ewart S.L., et al. Association of season of birth with DNA methylation and allergic disease // *Allergy*. 2016. Vol. 71. N 9. P. 1314–1324.
76. Dugué P.A., Geurts Y.M., Milne R.L., Lockett G.A., Zhang H., Karmaus W., Holloway J.W. Is there an association between season of birth and blood DNA methylation in adulthood? // *Allergy*. 2016. Vol. 71. N 10. P. 1501–1504.
77. Desiderio A., Spinelli R., Ciccarelli M., Nigro C., Miele C., Beguinot F., Raciti G.A. Epigenetics: spotlight on type 2 diabetes and obesity // *J. Endocrinol. Invest.* 2016. Vol. 39. N 10. P. 1095–1103.
78. Sterns J.D., Smith C.B., Steele J.R., Stevenson K.L., Gallicano G.I. Epigenetics and type II diabetes mellitus: underlying mechanisms of prenatal predisposition // *Front. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 2. P. 15.
79. Gillman M.W. Prenatal famine and developmental origins of type 2 diabetes // *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015. Vol. 3. N 10. P. 751–752.
80. Vaiserman A.M., Pasyukova E.G. Epigenetic drugs: a novel anti-aging strategy? // *Front. Genet.* 2012. Vol. 3. P. 224.

Поступила в редакцию  
15.02.2017  
Принята к печати  
02.03.2017

## GERONTOLOGY

### MALNUTRITION IN EARLY LIFE AND RISK OF TYPE 2 DIABETES: THEORETICAL BASIS AND EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE

O.G. Zabuga, A.M. Vaiserman\*

D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine, Vyshgorodskaya ul., 67, Kiev  
04114, Ukraine

\*e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

There is both animal and human evidence that inadequate nutrition during early development may affect risk for developing metabolic pathologies in adult life including type 2 diabetes (T2D). In populations of different countries, most findings indicating a causative relationship between undernutrition early in life and subsequent risk for T2D have been obtained from quasi-experimental investigations (“natural experiments”). Exposure to famine throughout prenatal and/or early postnatal development was shown to be associated with higher risk of T2D in many populations around the world. The epigenetic regulation of gene activity has been highlighted as a major mechanism linking early-life famine exposure and adult T2D. Prenatal exposure to the famine can induce persistent epigenetic alterations that have adaptive significance in early post-

natal development but may predispose to metabolic dysfunctions including T2D in later life. In this review, findings from quasi-experimental studies on the developmental programming of T2D are summarized and discussed.

**Keywords:** *type 2 diabetes, famine, natural experiment, quasi-experimental design, epigenetics, review*

**Сведения об авторах**

*Забуга Оксана Геннадьевна* – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории эпигенетики ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины”, Киев. Тел.: + 38 (044) 431-05-58; e-mail: narelem12@gmail.com

*Вайсерман Александр Михайлович* – докт. мед. наук, зав. лабораторией эпигенетики ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины”, Киев. Тел.: + 38 (044) 431-05-58; e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

## ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

## pH КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ И “СТАЦИОНАРНОЕ”/ХРОНОЛОГИЧЕСКОЕ СТАРЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОК

Г.В. Моргунова<sup>1</sup>, А.А. Клебанов<sup>1</sup>, Ф. Маротта<sup>2</sup>, А.Н. Хохлов<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>ReGenera Research Group for Aging Intervention and San Babila Clinic, Corso Matteotti 1/A, 20121 Milano, Italy

\*e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Существует точка зрения, согласно которой хронологическое старение (ХС) дрожжей и “стационарное” старение (СС) культивируемых клеток человека и животных являются следствием закисления ростовой среды. Однако целый ряд появившихся в последнее время работ свидетельствует о том, что этот процесс хотя и влияет в определенной степени на скорость “старения” клеток в стационарной фазе, но не определяет его полностью. По-видимому, определяющим фактором здесь является ограничение клеточной пролиферации, которое приводит к “старению” клеток даже в физиологически оптимальных условиях. При ХС дрожжей и при СС клеток млекопитающих ростовая среда закисляется до  $pH \leq 4$ . Если не допускать накопления кислоты в среде, можно увеличить продолжительность жизни культуры, однако клетки всё равно будут вымирать, только с меньшей скоростью. Наблюдаемые эффекты закисления среды при ХС и СС могут объясняться активацией высоко консервативных сигнальных путей роста, приводящих к развитию окислительного стресса, а эти процессы, в свою очередь, могут быть вовлечены в старение многоклеточных организмов и связаны с возникновением у них возрастных заболеваний. Ранее мы изучали влияние буферной ёмкости культуральной среды на СС трансформированных клеток китайского хомячка. Было установлено, что наличие в среде NEPES в концентрации 20 мМ не влияет на скорость роста клеток. При этом ростовые кривые выходили на “плато” в один и тот же день. Однако в среде с NEPES клетки, с одной стороны, достигали меньшей насыщающей плотности, чем в контроле (т.е. были “старше” согласно критериям геронтологической клеточно-кинетической модели), а с другой — претерпевали СС с гораздо меньшей скоростью (но все равно “старели”). Можно полагать, что внеклеточный pH, который, кстати, хорошо коррелирует с внутриклеточным, является хотя и важным (концепция И.А. Аршавского о роли ацидотической альтерации в старении), но не ключевым фактором, определяющим выживание клеток в стационарной культуре.

**Ключевые слова:** pH ростовой среды, буферная ёмкость, клеточные культуры, “стационарное старение”, хронологическое старение, обзор

Некоторое время назад на странице А.Н. Хохлова на портале ResearchGate появился комментарий к его статье «Какое старение у дрожжей “правильное”?» [1]. Согласно точке зрения автора этого комментария, Д.А. Кнорре, феномен хронологического старения (ХС) представляет собой лишь артефакт, связанный с закислением ростовой среды и легко устранимый с помощью различных агентов, стабилизирующих pH. В связи с этим, по мнению Кнорре, модель ХС непригодна для изучения старения многоклеточных организмов, а сам феномен (применительно, по-видимому, к любым клеточным культурам) представляет собой лишь процесс выживания клеток в стационарной фазе роста при “неестественных” условиях культивирования.

Модель “стационарного старения” (СС, англоязычный вариант — stationary phase aging) различных клеток животных и человека на протяжении многих лет используется в секторе эволюционной

цитогеронтологии биологического факультета МГУ как для изучения механизмов старения, так и для тестирования потенциальных геропротекторов и геропротомоторов [2]. Она основывается на идее, согласно которой ограничение клеточной пролиферации приводит к накоплению макромолекулярных повреждений в клетках культуры, сходных с повреждениями, накапливающимися в постмитотических клетках многоклеточного организма с возрастом [3–5]. В случае целого организма этот процесс (главным образом — накопление повреждений ДНК) инициирует нарушение функционирования органов и тканей, а это, в свою очередь, приводит к возрастанию вероятности смерти, т.е. к старению.

Собственно, обе упомянутые модельные системы (ХС и СС) фактически относятся к одному и тому же феномену, хотя для дрожжей чаще применяется термин ХС, а для животных клеток — СС. И ХС, и

СС обычно противопоставляются репликативному старению, выражающемуся в “возрастных” изменениях нормальных клеток по мере исчерпания ими митотического потенциала (феномен Хейфлика). При этом у обоих подходов к цитогеронтологическим исследованиям есть свои сторонники и противники [6–8]. Интересно также отметить, что феномен ХС/СС, судя по всему, свойствен и прокариотическим клеткам [9–12].

Суть ещё одной цитогеронтологической модели, применяемой для тестирования геропротекторов и геропромоторов и названной одним из нас клеточно-кинетической [13], заключается в том, что по изменению кинетики роста клеток в культуре (в пределах одного пассажа) под действием того или иного фактора делается вывод о возможном характере его влияния на процесс старения. При этом наиболее информативным параметром является насыщающая плотность культуры (“плато” на кривой роста). Чем больше этот показатель, тем более “молодыми” считаются исследуемые клетки. Данный подход основан на том обстоятельстве, что чем больше возраст донора нормальных фибробластов человека или их “возраст” *in vitro*, тем ниже “плато” на кривой их роста в культуре в пределах одного пассажа [14, 15]. Так вот, существуют данные о том, что этот показатель снижается при уменьшении рН культуральной среды в случае диплоидных фибробластов человека [16, 17]. Кроме того, пролиферативная активность культивируемых клеток тесно связана с величиной внутриклеточного и внеклеточного рН [18, 19]. Известно также, что при трансформации фибробластов китайского хомячка происходит увеличение внутриклеточного рН [20]. Существует даже целая концепция “ацидотического сдвига кислотно-щелочного гомеостаза” при старении *in vivo* [21], связывающая возрастное ухудшение функциональных возможностей клеток с уменьшением рН тканей. Все это позволяет предполагать наличие тесной связи между клеточным старением и вне- и внутриклеточным рН.

Ещё в 1985 г. Акатов и соавт. продемонстрировали [18], что насыщающая плотность культуры трансформированных клеток китайского хомячка сильно зависит от рН ростовой среды (чем меньше рН, тем меньше насыщающая плотность). В этой связи в наших собственных экспериментах [22], проведенных ещё 20 лет назад на клетках той же самой линии, мы попробовали оценить влияние изменения (прямо с момента посева) буферной ёмкости культуральной среды (путём добавки буфера НЕРЕС до конечной концентрации 20 мМ в обычную среду Игла с 10% сыворотки крупного рогатого скота) на кинетику роста и СС культуры в герметически закрытых культуральных флаконах. Контрольная культура росла на такой же среде, но без НЕРЕС. В опыте и контроле скорость роста клеток была приблизительно одинакова, причём кривые выходили на “плато” в один и тот же день.

Однако в среде с НЕРЕС клетки достигали меньшей насыщающей плотности, чем в контроле, что позволило считать их, согласно принципам клеточно-кинетической модели [13], более “старыми”, чем контрольные. В то же время, в среде с НЕРЕС клетки “стационарно старели” (т.е. погибали в стационарной фазе роста) с гораздо меньшей скоростью. Мы предположили, что НЕРЕС в определенной степени токсичен для исследованных клеток, а замедление СС было связано как с большей средней жизнеспособностью клеток, выживших в результате селекции, так и с замедленным истощением культуральной среды при пониженной плотности культуры.

Надо сказать, что имеющиеся в настоящий момент данные о влиянии рН культуральной среды на ХС или СС весьма неоднозначны. Известно, что при ХС дрожжей происходит накопление уксусной кислоты в культуральной среде, а при СС клеток млекопитающих – лактата. Считается, что именно вследствие этого среда закисляется до  $\text{pH} \leq 4$  [23–25]. Впрочем, существует и альтернативная точка зрения (А.Д. Виноградов, личное сообщение), согласно которой: 1) процесс гликолиза – превращение глюкозы в две молекулы лактата, сопряженный с образованием двух молекул АТФ, сам по себе НЕ приводит к закислению: отщепление протонов от молочной кислоты стехиометрически компенсируется их связыванием при фосфорилировании АДФ до АТФ при  $\text{pH} > 7$ . Наблюдаемое закисление ростовой среды обусловлено, по-видимому, различными АТФ-потребляющими (“АТФазными”) реакциями, сопровождающимися выделением протонов; 2) при образовании ацетата дрожжами закисление может происходить, а может и НЕ происходить, и определяется это, по-видимому, другими особенностями метаболизма в стационарной клеточной культуре. В обоих случаях значительную роль могут, в частности, играть выделение и поглощение  $\text{CO}_2$ .

Тем не менее, независимо от конкретных механизмов закисления ростовой среды, оно действительно происходит в стационарной клеточной культуре и, судя по всему, вносит определенный вклад в ХС/СС [23–26]. По данным Мураками с соавт. [23], ограничение питания или буферизация среды до  $\text{pH} 6.0$  замедляют ХС дрожжей. Однако результаты изучения возможного влияния буферизации среды роста дрожжей при ХС на их дальнейшее репликативное старение (известно, что ХС ускоряет последующее репликативное старение дрожжей [27]) выглядят противоречивыми. По одним данным [25], такое воздействие с помощью защелачивания способствует замедлению последующего репликативного старения, а по другим [28] – никак на него не влияет.

Отдельно хотелось бы остановиться на статье Леонтьевой и Благодосклонного, опубликованной в 2011 г. [24]. В ней совершенно правильно проводятся параллели между ХС дрожжей и СС культур клеток млекопитающих. Правда, нас несколько уди-

вила точка зрения авторов, согласно которой они провели такие параллели ВПЕРВЫЕ. Идея изучения механизмов старения на стационарных культурах самых разных клеток (включая нормальные и трансформированные клетки человека и животных) была сформулирована нами ещё в 80–90-х годах прошлого века [3, 29] и неоднократно упоминалась во многих наших последующих публикациях [30–33]. Тем более приятно, что данный подход получил одобрение и в нескольких последовавших комментариях к статье Леонтьевой и Благосклонного, опубликованных известными специалистами в области клеточного старения [34–37].

Хотелось бы обратить внимание на одно важное заключение, которое сделали в своей работе Леонтьева и Благосклонный. Они установили, что рапамицин (по-видимому, за счёт подавления образования лактата) продлевает жизнь “стационарно старым” клеткам. Количество живых клеток при этом остаётся таким же, как и при их культивировании без ингибитора TOR (target of rapamycin), но в культуре с рапамицином значительно увеличивается количество клеток, способных к делению. Таким образом, получается, что при СС происходит активация тех же самых метаболических сигнальных путей, что и при старении высших организмов, и важную роль в этом процессе играет, вероятно, закисление (возможно, происходящее, тем не менее, без участия лактата – см. выше). Ранее мы уже писали о связи аутофагии с клеточным старением и ограничением клеточной пролиферации [38]. Активация аутофагии путём ингибирования TOR, видимо, позволяет клеткам перейти на “экономный” режим питания и, как следствие, производить меньше продуктов метаболизма углеводов, образование которых в конечном итоге и приводит к закислению среды.

Основной вывод, который, как нам кажется, можно сделать из перечисленных статей, заключается в том, что, если не допускать накопления кислоты в ростовой среде (как дрожжей, так и клеток млекопитающих), можно увеличить продолжительность жизни культуры, однако клетки всё равно будут вымирать, хотя и с меньшей скоростью. Интересно, что в наших экспериментах по изучению СС клеток млекопитающих в герметически закрытых культуральных флаконах они “стареют по Гомпертцу” [2]. В то же время в некоторых работах, посвящённых влиянию буферной ёмкости ростовой среды на кинетику ХС дрожжей [26, 39], на графиках отчётливо видно, что в отсутствие “нор-

мализаторов” рН клетки просто быстро погибают “по экспоненте”, т.е. никакого старения нет. Поэтому не исключено, что только ПОСЛЕ буферизации среды эти клетки переходят в режим “нормального” ХС. Похожая, хотя и не полностью, картина наблюдается на соответствующих графиках в статье Леонтьевой и Благосклонного [24]. К сожалению, мы не смогли обнаружить в данной работе упоминания об использованной при культивировании концентрации  $\text{CO}_2$ . В то же время, именно углекислотный буфер в ростовой среде, на наш взгляд, определяет ситуацию с динамикой рН при культивировании.

По-видимому, наблюдаемые эффекты закисления среды могут объясняться активацией высоко консервативных сигнальных путей роста, приводящих к развитию окислительного стресса, а эти процессы, в свою очередь, могут быть вовлечены в старение многоклеточных организмов и связаны с возникновением у них возрастных заболеваний [24, 39, 40].

Можно полагать, что внеклеточный рН, который, кстати, хорошо коррелирует с внутриклеточным, является хотя и важным (упомянутая выше концепция И.А. Аршавского о роли ацидотической альтерации в старении), но не ключевым фактором, определяющим выживание клеток в стационарной культуре.

И последнее, что хотелось бы отметить. Как следует из упоминавшегося в начале статьи комментария Д.А. Кнорре, он считает модели ХС и СС неподходящими для изучения механизмов старения высших организмов, ибо они отражают лишь выживание клеток в стационарной фазе роста при “неестественных” условиях культивирования. В этой связи необходимо подчеркнуть, что, как нам представляется, ВСЕ модельные системы функционируют в неестественных условиях. Если условия естественные, то это уже не модель! Другое дело, что “неестественные” условия должны ПО ВОЗМОЖНОСТИ моделировать то, что происходит в целом многоклеточном организме [41, 42]. И нам кажется, что закисление культуральной среды при ХС или СС является как раз таким, “правильным”, фактором.

Авторы благодарны А.Д. Виноградову за ценные замечания, высказанные при обсуждении рукописи статьи.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
2. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
3. *Khokhlov A.N.* Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992. Vol. 663. P. 475–476.
4. *Khokhlov A.N.* Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.

5. *Khokhlov A.N.* Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastic? // *Biogerontology*. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
6. *Fabrizio P., Longo V.D.* The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // *Aging Cell*. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.
7. *Polymenis M., Kennedy B.K.* Chronological and replicative lifespan in yeast: do they meet in the middle? // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11. N 19. P. 3531–3532.
8. *Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B.* Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Metab*. 2012. Vol. 16. N 1. P. 18–31.
9. *Kapitanov A.B., Aksenov M.Y.* Ageing of prokaryotes. *Acholeplasma laidlawii* as an object for cell ageing studies: a brief note // *Mech. Ageing Dev*. 1990. Vol. 54. N 3. P. 249–258.
10. *Nyström T.* Stationary-phase physiology // *Annu. Rev. Microbiol*. 2004. Vol. 58. P. 161–181.
11. *Hicks W.M., Kotlajich M.V., Visick J.E.* Recovery from long-term stationary phase and stress survival in *Escherichia coli* require the L-isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase at alkaline pH // *Microbiology*. 2005. Vol. 151. N 7. P. 2151–2158.
12. *Gonidakis S., Longo V.D.* Assessing chronological aging in bacteria // *Cell senescence: methods and protocols* / Eds. L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, and G. Kroemer. Humana Press, 2013. P. 421–437.
13. *Khokhlov A.N.* The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // *Biomarkers of aging: expression and regulation*. Proceeding / Eds. F. Licastro and C.M. Caldarera. Bologna: CLUEB, 1992. P. 209–216.
14. *Schneider E.L., Smith J.R.* The relationship of *in vitro* studies to *in vivo* human aging // *Int. Rev. Cytol*. 1981. Vol. 69. P. 261–270.
15. *Macieira-Coelho A.* Kinetics of the proliferation of human fibroblasts during their lifespan *in vitro* // *Mech. Ageing Dev*. 1977. Vol. 6. N 5. P. 341–343.
16. *Froehlich J.E., Rachmeler M.* Inhibition of cell growth in the G<sub>1</sub> phase by adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate // *J. Cell Biol*. 1974. Vol. 60. N 1. P. 249–257.
17. *Конев С.В., Мажуль В.М.* Межклеточные контакты. Минск: Наука и техника, 1977. 312 с.
18. *Akatov V.S., Lezhnev E.I., Vexler A.M., Kublik L.N.* Low pH value of pericellular medium as a factor limiting cell proliferation in dense cultures // *Exp. Cell Res*. 1985. Vol. 160. N 2. P. 412–418.
19. *Kurkdjian A., Guern J.* Intracellular pH: measurement and importance in cell activity // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1989. Vol. 40. P. 271–303.
20. *Ober S.S., Pardee A.B.* Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987. Vol. 84. N 9. P. 2766–2770.
21. *Аршавский И.А.* Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития (основы негэнтропийного онтогенеза). М.: Наука, 1982. 270 с.
22. *Овчинникова Н.В., Сорока А.Е., Хоронжак С.В., Прохоров Л.Ю., Ушаков В.Л., Хохлов А.Н.* Буферная емкость культуральной среды: изучение в рамках клеточно-кинетической модели, применяемой для испытания геропротекторов и геропротомоторов // *Цитология*. 1997. Т. 39. № 6. С. 498–499.
23. *Murakami C.J., Wall V., Basisty N., Kaerberlein M.* Composition and acidification of the culture medium influences chronological aging similarly in vineyard and laboratory yeast // *PloS One*. 2011. Vol. 6. N 9. e24530.
24. *Leontieva O.V., Blagosklonny M.V.* Yeast-like chronological senescence in mammalian cells: phenomenon, mechanism and pharmacological suppression // *Aging (Albany NY)*. 2011. Vol. 3. N 11. P. 1078–1091.
25. *Murakami C., Delaney J.R., Chou A. et al.* pH neutralization protects against reduction in replicative lifespan following chronological aging in yeast // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11. N 16. P. 3087–3096.
26. *Burtner C.R., Murakami C.J., Kennedy B.K., Kaerberlein M.* A molecular mechanism of chronological aging in yeast // *Cell Cycle*. 2009. Vol. 8. N 8. P. 1256–1270.
27. *Ashrafi K., Sinclair D., Gordon J.I., Guarente L.* Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999. Vol. 96. N 16. P. 9100–9105.
28. *Wasko B.M., Carr D.T., Tung H., et al.* Buffering the pH of the culture medium does not extend yeast replicative lifespan // *F1000Research*. 2013. Vol. 2. 216.
29. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // *Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР, серия “Общие проблемы физико-химической биологии”*, том 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.
30. *Akimov S.S., Khokhlov A.N.* Study of “stationary phase aging” of cultured cells under various types of proliferation restriction // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 854. P. 520.
31. *Khokhlov A.N.* Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 854. P. 519.
32. *Khokhlov A.N.* Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem*. 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
33. *Khokhlov A.N.* From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // *Biophysics*. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
34. *Demidenko Z.N.* Chronological lifespan in stationary culture: from yeast to human cells // *Aging (Albany NY)*. 2011. Vol. 3. N 11. P. 1041–1042.
35. *Fabrizio P., Wei M.* Conserved role of medium acidification in chronological senescence of yeast and mammalian cells // *Aging (Albany NY)*. 2011. Vol. 3. N 12. P. 1127–1129.
36. *Kaerberlein M., Kennedy B.K.* A new chronological survival assay in mammalian cell culture // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11. N 2. P. 201–202.
37. *Mirisola M.G., Longo V.D.* Acetic acid and acidification accelerate chronological and replicative aging in yeast // *Cell Cycle*. 2012. Vol. 11. N 19. P. 3532–3533.
38. *Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2016. Vol. 71. N 4. P. 207–211.
39. *Burhans W.C., Weinberger M.* Acetic acid effects on aging in budding yeast: are they relevant to aging in higher eukaryotes? // *Cell Cycle*. 2009. Vol. 8. N 14. P. 2300–2302.
40. *Yucel E.B., Eraslan S., Ulgen K.O.* The impact of medium acidity on the chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*—lipids, signaling cascades, mitochondrial and vacuolar functions // *FEBS J*. 2014. Vol. 281. N 4. P. 1281–1303.
41. *Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2016. Vol. 71. N 2. P. 67–70.
42. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: from basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.

Поступила в редакцию  
08.02.2017  
Принята в печать  
02.03.2017

## GERONTOLOGY

## PH OF CULTURE MEDIUM AND STATIONARY PHASE/CHRONOLOGICAL AGING OF DIFFERENT CELLS

G.V. Morgunova<sup>1</sup>, A.A. Klebanov<sup>1</sup>, F. Marotta<sup>2</sup>, A.N. Khokhlov<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>*Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*<sup>2</sup>*ReGenera Research Group for Aging Intervention and San Babila Clinic, Corso Matteotti 1/A, 20121 Milano, Italy**\*e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

There is a point of view that the chronological aging (CA) of yeast and the stationary phase aging (SPA) of cultured animal and human cells are a consequence of growth medium acidification. However, a number of recent publications indicate that the process influences, to a certain extent, on the rate of “aging” of cells in the stationary phase of growth but does not determine it completely. Apparently, the key factor in this case is the cell proliferation restriction which leads to “aging” of the cells even under physiologically optimal conditions. During yeast CA and SPA of mammalian cells the medium is getting acidified to  $\text{pH} \leq 4$ . Preventing the medium acidification could make it possible to increase the culture life span, but the cells will still die out, albeit at a slower rate. Effects of the medium acidification observed during CA and SPA can be explained by the activation of highly conserved growth signaling pathways leading to the oxidative stress development; these processes, in turn, can be involved in aging of multicellular organisms and play a role in their age-related diseases. A while ago we studied the effect of buffer capacity of growth medium on SPA of transformed Chinese hamster cells. We found that HEPES at 20 mM had no effect on the cell growth, and both control and experimental growth curves reached plateau level on the same day. However, the cells grown with HEPES, on the one hand, reached lower saturation density than the control ones (i.e., were “older” in terms of the gerontological cell kinetics model), and on the other – underwent SPA at much slower rate (though still were “getting older”). It can be assumed that extracellular pH which, by the way, is well correlated with intracellular pH, is very important (I.A. Arshavsky’s concept on a role of the acidic alteration in aging) but not the key factor determining survival of cells in a stationary culture.

**Keywords:** *growth medium pH, buffer capacity, cell cultures, stationary phase aging, chronological aging, review*

**Сведения об авторах**

*Моргунова Галина Васильевна* – аспирантка сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru.

*Клебанов Александр Александрович* – научный сотрудник сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru.

*Маротта Франческо* – PhD, MD, руководитель Лаборатории исследований влияния на старение “РеДженера” и директор клиники Сан-Бабила, Корсо Маттеотти 1/А, 20121 Милан, Италия. Тел. +39-024077243; e-mail: fmarchimede@libero.it

*Хохлов Александр Николаевич* – докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru.

## ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 551.326.7

ВИДОВОЙ СОСТАВ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ВО ЛЬДУ ПРОЛИВА  
ВЕЛИКАЯ САЛМА БЕЛОГО МОРЯ ПЕРЕД ВЕСЕННИМ ЦВЕТЕНИЕМ

В.А. Кудрявцева\*, Т.А. Белевич, Л.С. Житина

Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: white-out@yandex.ru

Видовой состав диатомовых водорослей льдов пролива Великая Салма Кандалакшского залива Белого моря был исследован на пяти станциях в марте 2013 и марте 2014 гг. — в период, предшествующий весеннему цветению. Солёность подлёдной воды и толщина ледового покрова на станциях в 2013 и 2014 гг. достоверно не отличались. Во льду пролива Великая Салма обнаружено 59 таксонов диатомовых водорослей разного ранга (47 видов и 12 надвидовых таксонов), что составляет 61% от числа таксонов диатомей, обнаруженных во льдах пролива в течение всего ледового периода и 22% от видового богатства ледовых диатомей всего Белого моря. Виды *Stenoneis obtuserostrata* (Hustedt) Poulin и *Gyrosigma concilians* (Cleve) Okolodkov идентифицированы во льду Белого моря впервые. Индекс сходства Шимкевича-Симпсона между парами станций с достоверно различающимся составом ледовых диатомовых водорослей колебался в пределах от 0,44 до 0,80.

**Ключевые слова:** Белое море, диатомовые водоросли, криофлора, *Stenoneis obtuserostrata*, *Gyrosigma concilians*

Водоросли и цианобактерии, населяющие льды, играют важную роль в потоках вещества и энергии в полярных экосистемах [1, 2]. Вклад ледовых фотоавтотрофов в первичную продукцию достигает 57% в Центральной Арктике [2]. Первичная продукция, создаваемая ледовыми водорослями и цианобактериями, используется планктонными и бентосными животными [3]. Диатомовые водоросли — наиболее разнообразная группа фотоавтотрофов, населяющих морской лёд [4] и дающая основной вклад в суммарную биомассу ледовых водорослей [5].

Наблюдаемое в течение последних десятилетий потепление в Арктике [6] ведёт к уменьшению общей площади ледового покрова, его толщины и увеличению доли однолетних льдов [7]. Изменения ледового покрова могут сказаться как на составе первичных продуцентов во льду, так и на величине их первичной продукции [8, 9]. В связи с этим исследования биоты однолетних льдов, а такими как раз и являются сезонные льды Белого моря, приобретают все большую значимость.

Ледовый покров субарктического Белого моря является сезонным и существует 4–5 мес. [10]. В декабре происходит увеличение площади и толщины льда, в феврале и марте — его относительная стабилизация, а в апреле и мае — таяние ледового покрова.

К настоящему времени накоплены достаточно обширные сведения о биоте льдов Белого моря [8, 10, 11]. Ранее проведенные исследования в проливе Великая Салма Кандалакшского залива показали, что величина биомассы водорослей, населяющих льды, достигает максимальных значений в апреле [11]. Для видового состава и обилия ледовых водо-

рослей характерна выраженная пространственно-временная вариабельность, что определяет необходимость ежегодного изучения альгофлоры льдов в разных районах моря.

Цель настоящей работы состояла в выявлении таксономического состава диатомовых водорослей льдов пролива Великая Салма Кандалакшского залива Белого моря в марте 2013 г. и марте 2014 г. — в период, предшествующий весеннему цветению ледовых водорослей, а также в проведении сравнительного анализа выявленного состава диатомей с таковым арктических морей.

### Материалы и методы

Работу проводили в проливе Великая Салма в марте 2013 и марте 2014 гг. на базе Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова (ББС) МГУ имени М.В. Ломоносова. Отбор проб проводился на пяти станциях (рис. 1).

На каждой станции отбирали 1–2 керна льда с помощью кольцевого бура с внутренним диаметром 15 см. Каждый керн делили на части для сокращения времени таяния льда. Части керна помещали в отдельные пластиковые ёмкости и растапливали при комнатной температуре с добавлением не менее 1 л профильтрованной через мембранный фильтр (диаметр пор 2 мкм) и стерилизованной морской воды для предотвращения повреждения клеток водорослей в результате осмотического шока [12]. Пробы растаявшего льда концентрировали методом обратной фильтрации и фиксировали раствором Люголя. Определение видового состава диатомовых

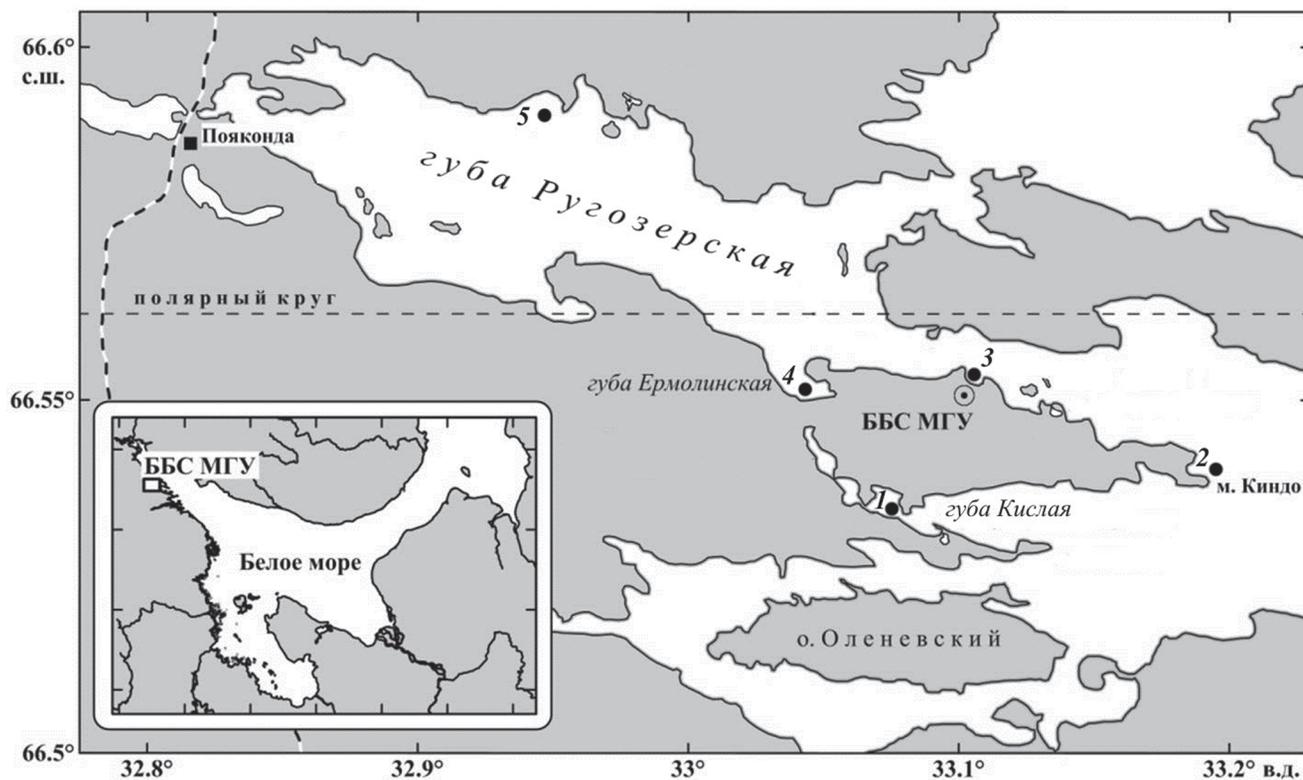


Рис. 1. Схема расположения станций отбора проб: 1 – кут Кислой губы; 2 – мыс Киндо; 3 – бухта ББС МГУ; 4 – Ермолинская губа; 5 – Ругозёрская губа

водорослей в сконцентрированных пробах проводили под световым микроскопом МИКМЕД-1 (ЛОМО, Россия) при увеличении 100–400х. Для более точной идентификации были приготовлены постоянные препараты для просмотра на световом и электронном (CAMScan, Великобритания) микроскопах. Для выжигания органического содержимого клеток использовали как  $H_2O_2$  (15%), так и концентрированную  $H_2SO_4$  с добавлением  $K_2Cr_2O_7$  [13].

Солёность проб льда, растаявшего без добавления морской воды, а также проб подлёдной воды определяли с помощью кондуктометра Cond 3150i (WTW, Германия).

Сходство видового состава фитоценозов оценивали с помощью коэффициента Шимкевича–Симпсона (S):

$$S = a / [a + \min(b, c)],$$

где  $a$  – число общих видов, встреченных в обоих сравниваемых фитоценозах,  $\min(b, c)$  – наименьшее число видов, встреченных только в одном из сравниваемых фитоценозов. При анализе сходства группы *Navicula* spp. и *Nitzschia* spp., включающие различные неидентифицированные виды соответствующих родов, были исключены из анализа.

### Результаты и обсуждение

**Абиотические факторы.** Согласно данным метеорологической станции ББС среднесуточная температура воздуха в феврале и марте была выше в 2014 г., чем в 2013 г. Однако толщина ледового

покрова на станциях достоверно не различалась в 2013 и 2014 гг. (табл. 1).

Таблица 1

Толщина льда (ТЛ, см) и снежного покрова (СП, см), солёность подлёдной воды (Свод., ‰) на станциях отбора ледовых кернов

Станция	Год	ТЛ, см	СП, см	Свод, ‰
1	2013	70,5	9	24,9
	2014	58	1	25,6
2	2013	33	10	25,5
	2014	26	< 1	25,5
3	2013	21,5	9	24,5
	2014	49	3	24,5
4	2013	55	25	22,0
	2014	52	0,5	21,9
5	2013	47	20	26,6
	2014	45	5	26,7

Глубина моря на станциях варьировала от 2 до 6 м. Солёность подлёдной воды изменялась в пределах 21,9–26,7 ‰. Солёность проб растаявшего льда варьировала от 0,2 ‰ до 5,2 ‰. Нижний слой кернов (1–2 см) со станции 4 (2013 и 2014 гг.) и станции 5 (2014 г.) имел визуально различимую коричневую окраску, что свидетельствует о высоком содержании водорослей. Согласно литературным данным,

Таблица 2

Список диатомовых водорослей, обнаруженных во льду на станциях в проливе Великая Салма Белого моря, и их экологическая приуроченность (ЭП)

Вид*	ЭП**	Станции				
		1	2	3	4	5
<b>Coscinodiscophyceae</b>						
<i>Melosira arctica</i> Dickie	Л	+			+	+
<b>Mediophyceae</b>						
<i>Attheya septentrionalis</i> (Østrup) Crawford	Пл, Л		+	+	+	+
<i>Chaetoceros</i> cf. <i>socialis</i> H.S. Lauder	Пл	+			+	+
<i>Chaetoceros holsaticus</i> F.Schütt	Пл				+	
<i>Chaetoceros</i> sp.	–		+		+	+
<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve	Пл				+	
<i>Skeletonema</i> cf. <i>marinoi</i> Sarno & Zingone	Пл		+			
<i>Thalassiosira hyalina</i> (Grunow) Gran	Пл		+			
<i>Thalassiosira nordenskiöldii</i> Cleve	Пл				+	
<i>Thalassiosira pacifica</i> Gran & Angst	Пл		+			
<i>Thalassiosira</i> sp.	–		+	+	+	+
<b>Bacillariophyceae</b>						
<i>Cocconeis</i> sp.	–	+	+			+
Bacillariophyceae gen. sp.	–	+	+	+	+	+
<i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenberg) Reimann & Lewin	Пл, Л, Б	+	+	+	+	+
<i>Diploneis litoralis</i> (Donkin) Cleve	Б	+			+	+
<i>Diploneis litoralis</i> var. <i>clathrata</i> (Østrup) Cleve	Б		+		+	
<i>Entomoneis alata</i> (Ehrenberg) Ehrenberg	Л				+	+
<i>Entomoneis kjellmanii</i> (Cleve) Poulin & Cardinal	Л				+	
<i>Entomoneis paludosa</i> (W. Smith) Poulin & Cardinal	Л, Б		+			+
<i>Entomoneis paludosa</i> var. <i>hyperborea</i> (Grunow) Poulin & Cardinal	Л, Б				+	+
<i>Entomoneis</i> sp.	–				+	+
<i>Fallacia forcipata</i> var. <i>densestriata</i> (A.W.F.Schmidt) Gogorev	Л, Пл, Б		+			
<i>Fragilariopsis cylindrus</i> (Grunow) Kriegera	Пл, Л	+	+	+		
<i>Fragilariopsis oceanica</i> (Cleve) Haslea	Пл	+		+	+	
<i>Fragilariopsis</i> sp.	–	+		+		
<i>Gomphonema exiguum</i> var. <i>arctica</i> (Grunow) Cleve	Б				+	
<i>Gomphonema</i> sp.	–				+	
<i>Gyrosigma concilians</i> (Cleve) Okolodkov	Л		+			
<i>Haslea</i> sp.	–				+	
<i>Licmophora</i> sp.	–				+	
<i>Lyrella</i> sp.	–				+	
<i>Martyana martyi</i> (H. ribaud-Joseph) Round	Б		+			
<i>Navicula algida</i> Grunow	Л					+

Окончание табл. 2

Вид*	ЭП**	Станции				
		1	2	3	4	5
<i>Navicula directa</i> (W. Smith) Ralfs	Л, Пл, Б		+		+	+
<i>Navicula granii</i> (Jørgensen) Gran	Пл					+
<i>Navicula cf. kariana</i> var. <i>detersa</i> Grunow	Пл, Л				+	+
<i>Navicula pelagica</i> Cleve	Л, Пл	+	+	+	+	+
<i>Navicula transitans</i> Cleve	Л		+		+	+
<i>Navicula transitans</i> var. <i>derasa</i> (Grunow) Cleve	Л, Б			+		
<i>Navicula cf. valida</i> Cleve & Grunow	Пл		+		+	+
<i>Navicula</i> spp.	–	+	+	+	+	+
<i>Nitzschia frigida</i> Grunow	Л	+	+	+	+	+
<i>Nitzschia neofrigida</i> Medlin	Л, Пл	+			+	+
<i>Nitzschia cf. polaris</i> Grunow	Пл, Л				+	
<i>Nitzschia cf. sinuata</i> (Thwaites) Grunow	Пл		+		+	+
<i>Nitzschia cf. subtilis</i> (K tzing) Grunow	Пр, Пл				+	
<i>Nitzschia tryblionella</i> Hantzsch	Пл					+
<i>Nitzschia</i> spp.	–	+	+	+	+	+
<i>Pauliella taeniata</i> (Grunow) Round & Basson	Пл, Л	+	+			
<i>Pinnularia quadratarea</i> (Schmidt) Cleve	Пл, Л	+			+	+
<i>Pinnularia quadratarea</i> var. <i>bicontracta</i> (strup) Heiden	Пл				+	
<i>Pleurosigma angulatum</i> (J.T. Quekett) W. Smith	Пл				+	
<i>Pleurosigma elongatum</i> W. Smith	Пл		+			
<i>Pleurosigma cf. normanii</i> Ralfs	Пл				+	
<i>Pleurosigma stuxbergii</i> Cleve & Grunow	Л		+	+		
<i>Pseudo-nitzschia cf. seriata</i> (Cleve) H. Peragallo	Пл		+			
<i>Stenoneis obtuserostrata</i> (Hustedt) Poulin	Л, Пл		+			
<i>Tetracyclus cf. lacustris</i> Ralfs	Пр, Б		+			
<i>Tryblionella cf. littoralis</i> (Grunow) D.G. Mann	Пл	+				

Примечание: \* – приведено с учётом последних таксономических изменений [14], \*\* – приведено согласно [15].

Условные обозначения: Б – бентосные, Л – ледовые, Пл – планктонные, Пр – пресноводные.

наибольшие значения суммарной биомассы ледовых водорослей отмечаются в апреле [11]. Таким образом, наши исследования, проведенные в марте, пришлись на начало периода активного роста водорослей и накопления биомассы.

**Таксономический состав диатомей.** Всего в весенних льдах пролива Великая Салма было обнаружено 59 таксонов диатомовых водорослей разного ранга (табл. 2). Часть водорослей определена до рода или на уровне более высокого таксономического ранга. Для таких форм приоритетное местообитание не определено. Из идентифицированных до вида диатомей 23 вида являются типично ледовыми

либо лёд входит в число их приоритетных местообитаний. Планктонные диатомеи (18 видов) составляли значительную часть (38%) от общего числа идентифицированных до вида диатомей.

Встреченные нами 59 таксонов диатомовых водорослей составляют 61% от числа таксонов диатомей, обнаруженных в проливе в течение всего ледового периода (97 таксонов, [11]), и 22% от видового богатства ледовых диатомей всего Белого моря (272 таксона, [5]).

По числу видов преобладали пеннатные формы (Bacillariophyceae, 38 видов), что характерно для ледовых водорослей всей морской Арктики [4].

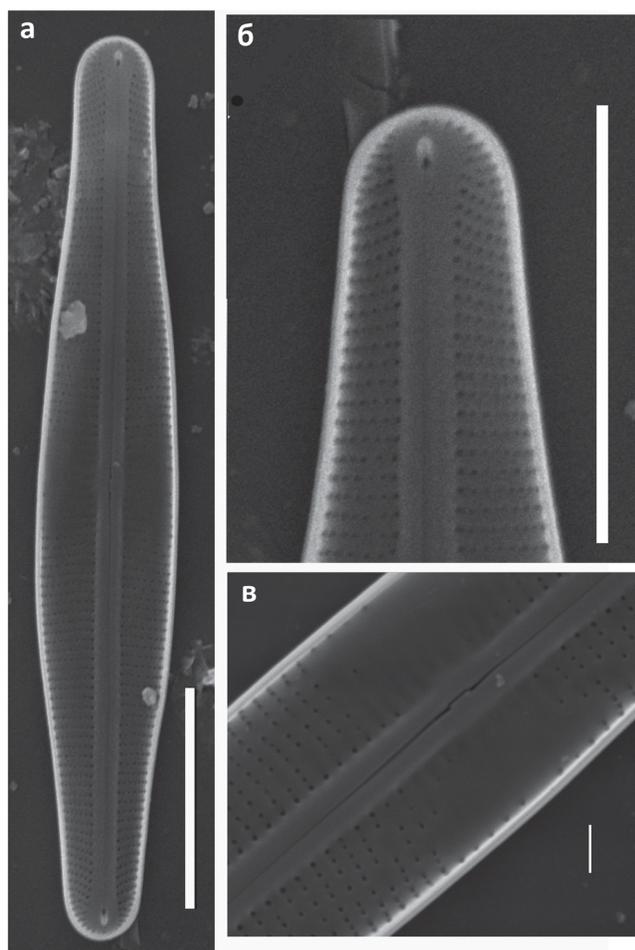


Рис. 2. Электронные микрофотографии *Stenoneis obtuserostrata* (Hustedt) Poulin: а – общий вид створки; б – концевая часть створки; в – центральная часть створки. Масштабный отрезок: а, б – 10 мкм, в – 1 мкм

Впервые во льду Белого моря идентифицированы два вида – *Stenoneis obtuserostrata* и *Gyrosigma concilians* (станция 2) (рис. 2 и 3). Эти диатомеи отмечались во льдах арктических шельфовых морей – Чукотского, Восточно-Сибирского, Лаптевых [16]. *G. concilians* идентифицирована также и во льду Баренцева моря [16].

Интегральная биомасса водорослей во льду Белого моря колебалась от 2,5 до 38,4 мгС/м<sup>2</sup>. Вклад диатомей составлял 58–90%. Колониальные виды пеннатных диатомей *Nitzschia frigida*, *Navicula pelagica* и *Fragilariopsis cylindrus*, а также крупноклеточная *Pleurosigma stuxbergii* доминировали на разных станциях. Высокое обилие этих видов характерно для льдов Арктики [16]. В тоже время на станции 2 (2013 г.) значительный вклад в биомассу вносила водоросль *Thalassiosira* sp. Доминирование видов рода *Thalassiosira* не является характерным для льдов Арктики, однако ранее уже отмечалось в прибрежных льдах Кандалакшского залива [11].

**Сходство таксономического состава диатомей на разных станциях.** Наибольшее число таксонов выявлено на станции 4 (38), наименьшее – на станции 3 (13).

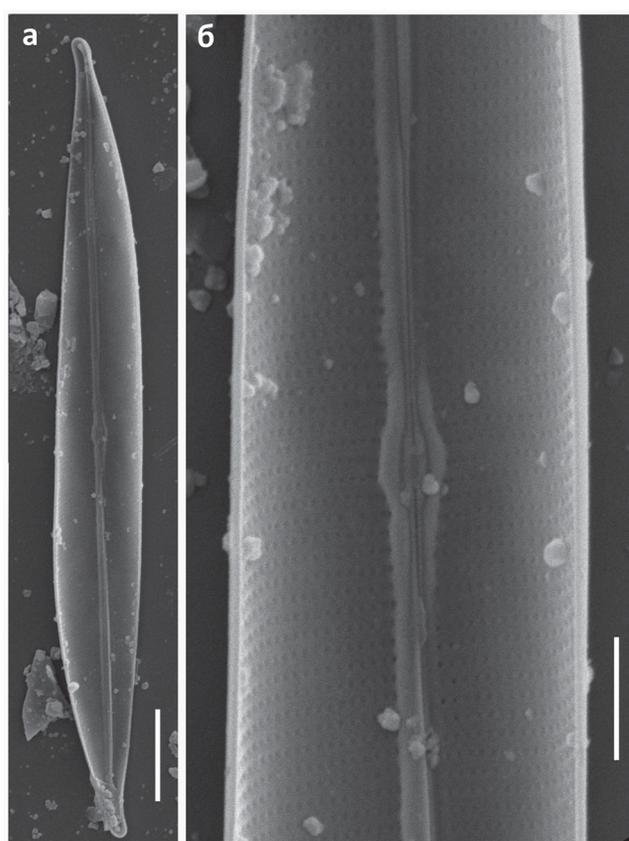


Рис. 3. Электронные микрофотографии *Gyrosigma concilians* (Cleve) Okolodkov: а – общий вид створки; б – центральная часть створки. Масштабный отрезок: а – 10 мкм, б – 3 мкм

Состав диатомовых водорослей на разных станциях достоверно различался, за исключением пар станций 1 и 3, 4 и 5. Индекс сходства Шимкевича–Симпсона между парами станций с достоверно различающимся составом ледовых диатомей составил 0,44–0,80. Сообщество диатомовых водорослей станции 2 имело наименьшее сходство с исследуемыми сообществами остальных станций. Это, по-видимому, обусловлено расположением станции 2 на открытом участке пролива, где ледовый покров в наибольшей степени подвергается деформации [11].

Таблица 3

Коэффициент сходства Шимкевича–Симпсона таксономического состава диатомей во льдах пролива Великая Салма

Станции	1	2	3	4
2	0,47**			
3	0,64^	0,73*		
4	0,60**	0,44**	0,64**	
5	0,67*	0,52*	0,73*	0,80^

Условные обозначения: \* – различия достоверны при  $p = 0,05$ ; \*\* – различия достоверны при  $p = 0,01$ ; ^ – различия недостоверны.

В целом для сообществ ледовых водорослей характерна выраженная пространственная изменчивость состава и структуры. Мезомасштабную (сотни мет-

ров — километры) изменчивость определяет совокупность факторов, основными из которых являются: условия освещённости, зависящие от толщины льда и снежного покрова [17–19], концентрация биогенных элементов [17, 20], солёность и температура [21], пористость льда и морфология его нижней поверхности [22, 23], а также генезис и физическая деформация ледового покрова [18].

Изменчивость ледовых сообществ в масштабе тысяч километров можно проиллюстрировать на примере сравнительного анализа состава ледовых диатомей в проливе Великая Салма субарктического Белого моря (настоящая работа) и в прибрежных льдах арктического моря Бофорта в период перехода от зимы к весне [24]. Сравнение показало, что таксономический состав диатомей достоверно различается ( $p = 0,01$ ), коэффициент сходства составил 0,45. Среди общих для обоих районов видов и разновидностей диатомей (всего 21) преобладали те, чьим приоритетным местообитанием является лёд.

Аналогичный анализ выявил ещё меньшее сходство между диатомовыми льда в проливе Великая Салма и вблизи Северного полюса летом [25]. Индекс сходства составил 0,26. Общими для обоих районов являлись ледовые (*Nitzschia frigida*, *Nitzschia neofrigida*, *Melosira arctica*, *Fallacia forcipata* var. *densestriata*, *Fragilariopsis cylindrus*, *Navicula algida*, *Navicula directa*, *Cylindrotheca closterium*, *Navicula transitans*, *Navicula transitans* var. *derasa*, *Pinnularia*

*quadratarea*), планктонные (*Thalassiosira nordenskiöldii*) и бентосные (*Diploneis litoralis* var. *clathrata*) диатомеи.

Таким образом, во льду пролива Великая Салма Кандалакшского залива Белого моря в предшествующий цветению ледовых водорослей период (март, 2013 и 2014 гг.) обнаружено 47 видов и 12 таксонов более высокого ранга диатомовых водорослей, что составляет 61% от числа таксонов диатомей, обнаруженных во льдах пролива в течение всего ледового периода и 22% от видового богатства ледовых диатомей всего Белого моря.

Впервые во льду Белого моря идентифицированы диатомеи *Stenoneis obtuserostrata* и *Gyrosigma concilians*, которые ранее отмечались во льдах арктических шельфовых морей.

Таксономический состав диатомовых водорослей во льдах характеризовался выраженной мезомасштабной пространственной неоднородностью. Сходство между парами станций с достоверно различающим составом ледовых диатомей составляло 0,44–0,80.

Авторы благодарят к.б.н. Е.Д. Краснову, к.б.н. Д.А. Воронова и сотрудников ББС за помощь в проведении работ.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова часть 2 (тема №АААА-А16-116021660052-0) и при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Legendre L., Ackley S.F., Dieckmann G.S., Gulliksen B., Horner R., Hoshiai T., Melnikov I.A., Reeburgh W.S., Spindler M., Sullivan C.W. Ecology of sea ice biota. 2. Global significance // Polar Biol. 1992. Vol. 12. N 3. P. 429–444.
2. Gosselin M., Levasseur M., Wheeler P.A., Horner R.A., Booth B.C. New measurements of phytoplankton and ice algal production in the Arctic Ocean // Deep-Sea Res. Pt. II. 1997. Vol. 44. N 8. P. 1623–1644.
3. McMahon K.W., Ambrose W.G., Johnson B.J., Sun M.-Y., Lopez G.R., Clough L.M., Carroll M.L. Benthic community response to ice algae and phytoplankton in Ny Ålesund, Svalbard // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2006. Vol. 310. N 1. P. 1–14.
4. Poulin M., Daugbjerg N., Gradinger R., Ilyash L., Ratkova T., von Quillfeldt C.H. The pan-Arctic biodiversity of marine pelagic and sea-ice unicellular eukaryotes: a first-attempt assessment // Mar. Biodiv. 2011. Vol. 41. N 1. P. 13–28.
5. Ильяш Л.В., Житина Л.С. Сравнительный анализ видового состава диатомовых водорослей льдов морей Российской Арктики // Ж. общ. биол. 2009. Т. 70. № 2. С. 143–154.
6. Chapman W.L., Walsh J.E. Recent variation of sea ice and air temperatures in high latitudes // Bull. Am. Meteorol. Soc. 1993. Vol. 74. N 1. P. 33–47.
7. Perovich D.K., Richter-Menge J.A. Loss of sea ice in the Arctic // Ann. Rev. Marine Sci. 2009. Vol. 1. P. 417–441.
8. Melnikov I.A., Dikarev S.N., Egorov V.G., Kolosova E.G., Zhitina L.S. Structure of the coastal ice ecosystem in the zone of sea-river interactions // Oceanology. 2005. Vol. 45. N 4. P. 511–519.
9. Lee S.H., Whitley T.E., Kang S.-H. Spring time production of bottom ice algae in the landfast sea ice zone at Barrow, Alaska // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2008. Vol. 367. N 2. P. 204–212.
10. Krell A., Ummenhofer C., Kattner G., Naumov A., Evans D., Dieckmann G.S., Thomas D.N. The biology and chemistry of land fast ice in the White Sea, Russia — A comparison of winter and spring conditions // Polar Biol. 2003. Vol. 26. N 11. P. 707–719.
11. Ильяш Л.В., Житина Л.С., Кудрявцева В.А., Мельников И.А. Сезонная динамика видового состава и биомассы водорослей в прибрежных льдах Кандалакшского залива Белого моря // Ж. общ. биол. 2012. Т. 73. № 6. С. 461–472.
12. Garrison D.I., Buck K.R. Organism losses during ice melting: a serious bias in sea ice community studies // Polar Biol. 1986. Vol. 6. N 4. P. 237–239.
13. Диатомовые водоросли СССР (ископаемые и современные). Т.1. Отв. ред. Прошкина-Лавренко А.И. Л.: Наука, 1974. 403 с.
14. AlgaeBase [Электронный ресурс]. 1996. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения: 10.03.2017).
15. von Quillfeldt C.H., Ambrose W.G., Clough L.M. High number of diatom species in first-year ice from the Chukchi Sea // Polar Biol. 2003. Vol. 26. N 12. P. 806–818.
16. Житина Л.С., Ильяш Л.В. Видовой состав диатомовых водорослей льдов морей российской Арктики // Арктика и Антарктика. 2010. № 7 (41). С. 115–149.

17. Gosselin M., Legendre L., Therriault J.-C., Demers S. Light and nutrient limitation of sea ice microalgae // J. Phycol. 1990. Vol. 26. N 2. P. 220–232.
18. Rysgaard S., Kühl M., Glud R.N., Hansen J.W. Biomass, production and horizontal patchiness of sea ice algae in a high-Arctic fjord (Young Sound, NE Greenland) // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2001. Vol. 223. P. 15–26.
19. Riedel A., Michel C., Gosselin M., LeBlanc B. Winter–spring dynamics in sea-ice carbon cycling in the coastal Arctic Ocean // J. Mar. Syst. 2008. Vol. 74. N 3–4. P. 918–932.
20. Smith R.E.H., Gosselin M., Taguchi S. The influence of major nutrients on the growth and physiology of high arctic ice algae // J. Mar. Syst. 1997. Vol. 11. N 1–2. P. 63–70.
21. Cota G.F., Smith R.E.H. Ecology of bottom ice algae: II. Dynamics, distributions and productivity // J. Mar. Syst. 1991. Vol. 2. N 3–4. P. 279–295.
22. Krembs C., Tuschling K., Juterzenka K. The topography of the ice-water interface – its influence on the colonization of sea by algae // Polar Biol. 2002. Vol. 25. N 2. P. 106–117.
23. Mundy C.J., Barber D.G., Michel C., Marsden R.F. Linking ice structure and microscale variability of algal biomass in Arctic first-year sea ice using an in situ photographic technique // Polar Biol. 2007. Vol. 30. N 9. P. 1099–1114.
24. Różańska M., Gosselin M., Poulin M., Wiktor J.M., Michel C. Influence of environmental factors on the development of bottom ice protist communities during the winter–spring transition // Mar. Ecol.-Prog. Ser. 2009. Vol. 386. P. 43–59.
25. Katsuki K., Takahashi K., Onodera J., Jordan R.W., Suto I. Living diatoms in the vicinity of the North Pole, summer 2004 // Micropaleontology. 2009. Vol. 55. N 2–3. P. 137–170.

Поступила в редакцию  
07.12.2016

Принята в печать  
02.03.2017

## HYDROBIOLOGY

### DIATOMS IN THE ICE OF VELIKAYA SALMA STRAIGHT OF THE WHITE SEA BEFORE THE SPRING ALGAL BLOOM

V.A. Kudryavtseva\*, T.A. Belevich, L.S. Zhitina

Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia  
\*e-mail: white-out@yandex.ru

Diatom species composition in the ice of Velikaya Salma straight of Kandalaksha bay of the White Sea was studied in 5 stations in March, 2013–2014 – prior to the spring algal bloom. Under-ice water salinity and ice thickness did not differ significantly between the two years. In total 59 diatom taxa (47 species and 12 taxa of higher taxonomic ranks) were found in the ice of Velikaya Salma straight, which makes 61% of the number of diatom taxa found in Velikaya Salma ice during the whole ice period and 22% of all the White Sea ice species. Species *Stenoneis obtuserostrata* (Hustedt) Poulin and *Gyrosigma concilians* (Cleve) Okolodkov were identified in the White Sea ice for the first time. Szymkiewicz-Simpson similarity coefficient for pairs of the stations with significant difference was 0.44–0.80.

**Key words:** White sea, diatoms, ice algae, *Stenoneis obtuserostrata*, *Gyrosigma concilians*.

#### Сведения об авторах

Кудрявцева Василиса Александровна – инженер кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: white-out@yandex.ru

Белевич Татьяна Алексеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: 3438083@list.ru

Житина Людмила Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: lgitina@mail.ru

## МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 581.2+58.01/.07

АНОМАЛИИ РАННИХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ *ERYSIPHE GRAMINIS TRITICI* ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Г.А. Аветисян\*, Т.В. Аветисян

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4  
\*e-mail: avetisyang@yandex.ru

Исследовали влияние окислительного стресса на начальные этапы взаимодействия возбудителя мучнистой росы пшеницы и растения-хозяина. Показано, что воздействие перекисью водорода и 3-амино-1,2,4-триазолом приводит к образованию аномальных ростковых трубок и нежизнеспособных колоний на поверхности листьев пшеницы. Явления, которые наблюдали при моделировании окислительного стресса путём воздействия прооксидантами, сходны с теми, которые ранее были описаны для устойчивых растений. Это позволяет предположить, что причиной аномального развития патогена на растениях может быть воздействие активных форм кислорода, возникающих в устойчивом растении в процессе защитных реакций.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, мучнистая роса, инфекционные структуры, перекись водорода, 3-амино-1,2,4-триазол, пшеница, окислительный стресс

В последние годы процесс первичной инфекции мучнисторосяными грибами изучался наиболее интенсивно, так как соответствующие исследования свидетельствуют о важности ранних стадий инфицирования для процесса развития заболевания [1, 2]. Первые этапы взаимоотношений растения-пшеницы и мучнисторосяного гриба зависят от способности патогена максимально реализовывать патологический процесс, т.е. процесс прорастания конидий и дифференциацию инфекционных структур, обеспечивающих заражение растения и дальнейшее развитие болезни [3, 4].

Процесс заражения пшеницы мучнистой росой состоит из ряда стадий. Конидия мучнисторосяного гриба, попадая на поверхность листа растения, образует вначале первичную ростковую трубку и затем аппрессориальную ростковую трубку, формирующую аппрессорий [5]. В случае восприимчивости растения к грибному патогену примерно через 24 ч после инокуляции внутри эпидермальной клетки растения-хозяина образуется гаустория, которая поглощает питательные вещества из клетки хозяина. Дальнейшее развитие гриба сопровождается ростом гиф мицелия и образованием гаусторий второго, третьего и т.д. порядков [6].

Развитие патогена на устойчивых растениях имеет свои особенности. При несовместимых комбинациях наблюдаются различные отклонения в дифференциации инфекционных структур патогена. Эти нарушения ведут к изоляции возбудителя болезни уже на первых этапах патогенеза, что способствует снижению инфекционной нагрузки.

Исследования последних лет показали важную роль в патогенезе мучнистой росы злаков активных

форм кислорода (АФК), которые являются посредниками активации иммунного ответа растения, а также участвуют в контроле структурной организации клеточной стенки [7, 8, 9]. Многими исследователями было установлено, что окислительный стресс влияет на ранние стадии развития *Erysiphe graminis* [2, 10].

В задачу данной работы входило изучение особенностей ранних стадий развития возбудителя мучнистой росы пшеницы под влиянием окислительного стресса. Окислительный стресс моделировали перекисью водорода и 3-амино-1,2,4-триазолом (3-АТА), который способствует повышению количества эндогенной перекиси водорода посредством ингибирования пероксидазы и каталазы [11].

## Материалы и методы

Для экспериментов были использованы растения мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. и возбудитель мучнистой росы пшеницы *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *tritici* Marchal.

Семена растений пшеницы выращивали при температуре 20–22°C на растворе Кнопа в рулонах из фильтровальной бумаги. Пятнадцатидневные проростки пшеницы инокулировали конидиями *E. graminis*, культуру которой поддерживали на восприимчивой пшенице. Инфицированные отделенные листья проростков пшеницы инкубировали в чашках Петри с водными растворами перекиси водорода и 3-АТА абаксиальной стороной вверх. В контроле использовали дистиллированную воду.

На 5–6-е сут после инфицирования число видимых колоний возбудителя мучнистой росы подсчитывали с помощью бинокулярной лупы на не-

скольких участках поверхности листа растения площадью 1 см<sup>2</sup> каждый. Для каждого варианта опыта вычисляли среднюю плотность колоний на 15–30 препаратах.

Изучали влияние окислительного стресса и его предполагаемый защитный эффект на разных стадиях патогенеза. Исследуемые вещества вносили в среду инкубации отделенных листьев через определенные промежутки после инфицирования и на ограниченный период. Были выбраны концентрации 4 мМ и 10 мМ для 3-АТА и 5 мМ для перекиси водорода как минимальные концентрации с выраженным ингибированием развития мучнисторосяного гриба.

Динамику развития и дифференциации инфекционных структур возбудителя мучнистой росы исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого был отобран растительный материал на 3–9-е сут после инфицирования. Образцы листовой ткани исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа LEO-1430 VP (Carl Zeiss, Германия) без химической фиксации в условиях низкого вакуума (VP-режим) при комнатной температуре или в условиях высокого вакуума при –30 °С с применением замораживающей приставки Deben UK (Великобритания).

При сравнении результатов исследования контрольной и экспериментальной групп, а также изменений показателей в разные периоды времени использовали критерий Уилкоксона. Различия между значениями параметров считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

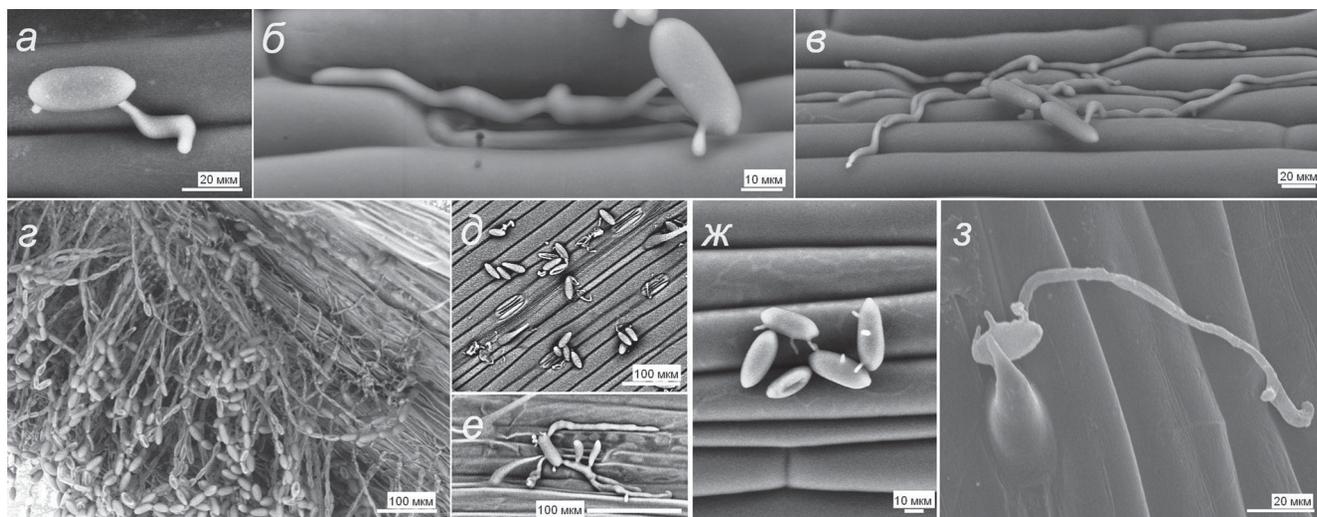
Конидии *E. graminis*, попадая на поверхность листьев пшеницы, прорастают, образуя первичную ростковую трубку и апрессорий в течение 24–48 ч

после инокуляции (рисунок, а). К концу данного периода внутри клетки эпидермиса растения-хозяина, как правило, образуется гаустория, служащая для поглощения питательных веществ. Через 48 ч в контроле у нормально развивающихся конидий можно наблюдать одну или несколько ростковых трубок, которые затем удлиняются, развиваясь в гифы эктофитного мицелия и формируя микроколонию (рисунок, б). Через 72 ч после инфицирования были заметны развитые колонии с гифами длиной до 400–450 мкм (рисунок, в).

Различия в формировании инфекционных структур гриба можно обнаружить уже через 24 ч после заражения. Так, воздействие 3-АТА увеличивало количество конидий, не способных к прорастанию (рисунок, д) или образующих аномальные инфекционные структуры (рисунок, е). К моменту образования в контроле развитых колоний с многочисленными конидиеносцами (рисунок, в) в вариантах с сильным ингибированием развития мучнистой росы в единичных случаях наблюдали только микроколонию. При этом они имели, как правило, многочисленные утолщенные и, вероятно, не функционирующие ростковые трубки (рисунок, е). При высоких концентрациях 3-АТА наблюдали образование множества зачатков гиф, не развивающихся в дальнейшем.

Развитие возбудителя мучнистой росы в присутствии перекиси водорода имело свои особенности. При концентрациях данного вещества 0,5–5 мМ наблюдали образование конидий с большим количеством ростковых трубок (рисунок, ж) или удлиненной апрессориальной ростковой трубкой (рисунок, з). При использовании 10 мМ перекиси водорода развитие патогена останавливалось на стадии формирования апрессория и дальнейшего образования колоний не происходило.

Ранее нами было показано, что обработка отделенных листьев пшеницы как 3-АТА, так и пе-



**Рисунок.** Этапы развития *Erysiphe graminis* на листьях пшеницы (СЭМ, 48–72 ч после инфицирования): а, б, в – контроль; г, д, е – при обработке инфицированных листьев пшеницы 3-амино-1,2,4-триазолом; ж, з – при обработке инфицированных листьев пшеницы перекисью водорода

рекистью водорода ингибирует развитие колоний патогена [12]. При увеличении концентрации данных веществ ингибирующая активность также возрастала, а высокие концентрации (10 мМ и более для 3-АТА и 5 мМ и более для перекиси водорода) полностью предотвращали развитие колоний патогена.

Далее нами были проведены исследования, направленные на изучение влияния окислительного стресса на разные этапы развития мучнисторосяного гриба (таблица). В варианте с постоянным присутствием 3-АТА в среде инкубации листьев наблюдали сильное ингибирование числа колоний. При этом более высокая концентрация оказывала более сильное действие. В остальных вариантах 3-АТА вносили на период 24 ч на первые, вторые и третьи сутки после инфицирования. Как видно из представленных данных, все варианты с обработкой 3-АТА в течение ограниченного времени также показали достоверное ингибирование инфекции ( $p < 0,001$ ). При этом наиболее сильное действие наблюдали на ранних этапах инфицирования (1 сут), что соответствует стадиям прорастания конидии, образования аппрессория и первичной гаустории. При обработке листьев пшеницы перекисью водорода также происходило достоверное ингибирование роста патогена, а в варианте с постоянным присутствием перекиси водорода во время всего эксперимента концентрация 5 мМ практически полностью предотвращала появление колоний.

Таблица

Влияние длительности применения 3-АТА и  $H_2O_2$  на развитие колоний мучнисторосяной пшеницы на адаксиальной стороне листа (суммарное число колоний в расчете на  $1\text{ см}^2$ , повторность 15–30 препаратов). Данные представлены в виде средних арифметических значений и стандартных ошибок среднего

Время	Концентрация 3-АТА		Концентрация $H_2O_2$
	4 мМ	10 мМ	5 мМ
1 сут	7,7±1,3	1,3±0,2	1,2±0,2
2 сут	9,5±1,3	4,3±0,5	10,0±0,8
3 сут	8,7±1,0	3,6±0,7	5,3±0,4
С 1 по 3 сут	6,3±0,5	0,8±0,2	0,2±0,1
Контроль ( $H_2O$ )	17,2±1,6	12,2±1,4	15,1±0,9

Необходимо отметить сходные тенденции во времени применения обоих исследуемых веществ. Так, наибольшую активность наблюдали в тех вариантах с краткосрочной инкубацией в течение 24 ч в присутствии 3-АТА и экзогенной перекиси водорода, где данные вещества вносили в первые сутки после инфицирования. При их внесении на вторые сутки наблюдали менее выраженное ингибирование. При обработке на третьи сутки ингибирующее действие вновь несколько усиливалось.

Исследования последних лет показали, что характер патогенеза мучнисторосяной росы злаков в значительной степени зависит от окислительного метаболизма [2, 7, 13]. Помимо непосредственного токсического воздействия на клетки патогена АФК действуют в качестве сигнальных молекул, принимая участие в индукции локальной и системной приобретенной устойчивости [14]. Активация кислорода является одним из самых ранних ответов растительной клетки на инфицирование. Время существенного повышения уровня АФК, т.е. время реакции растения на инфицирование, на начальных стадиях патогенеза играет важную роль, поскольку от него зависит момент включения активных защитных реакций растения.

В наших опытах экзогенная перекись водорода и 3-АТА ингибировали развитие мучнисторосяного патогена, существенно снижали интенсивность образования колоний и повышали устойчивость пшеницы к возбудителю мучнисторосяной росы. Патоген-ингибирующая активность данных веществ возрастала с увеличением концентрации, и высокие концентрации полностью предотвращали развитие колоний патогена. По-видимому, ингибирующее действие экзогенных прооксидантов в определенной мере соответствует представлениям о защитной роли АФК при патогенезе.

Поскольку АФК обладают токсичностью не только по отношению к патогену, но и по отношению к самому растению-хозяину, в клетках растения их количество строго регулируется при участии антиоксидантных систем. Антиоксидантные защитные механизмы лимитируют продолжительность жизни АФК, защищая клетку от вредного воздействия перекиси водорода, образованной при восстановлении молекулярного кислорода. Таким образом, увеличение количества перекиси водорода ограничено во времени. Наряду с интенсивностью образования АФК время начала и время окончания окислительного “взрыва”, по-видимому, играют важную и до сих пор мало исследованную роль в регуляции иммунного ответа клетки хозяина.

В наших опытах данный аспект действия АФК моделировали путем кратковременного внесения экзогенных прооксидантов в разные сроки после инокуляции патогена. Показано, что продолжительность воздействия данными веществами оказывает влияние на величину ингибирующего эффекта. При этом стадии развития мучнисторосяного патогена, соответствующие первым и третьим суткам после инфицирования, имеют большую чувствительность, или, наоборот, стадии развития патогена, протекающие на вторые сутки, более устойчивы к ингибированию. По-видимому, большее ослабление ингибирования на вторые сутки в случае перекиси водорода можно объяснить её быстрым разложением после окончания инкубации. В то же время, накопленное в течение 2 сут количество

3-АТА продолжает действовать и в последующий период, когда патоген вновь оказывается чувствительным к ингибитору.

Развитие мицелия мучнисторосяных грибов злаков происходит на поверхности листьев растений. Этот факт облегчает исследование данного патогена с помощью СЭМ. Как показали наши исследования, обработка перекисью водорода и 3-АТА ингибирует формирование колоний возбудителя мучнистой росы и подавляет рост патогена на ранних стадиях развития. Аномальная дифференциация инфекционных структур возбудителя мучнистой росы также происходила при концентрациях 3-АТА и экзогенной перекиси водорода, близких к тем, которые ингибировали развитие видимых невооруженным глазом колоний.

Как известно, некоторые соединения могут оказывать влияние на раннее развитие фитопатогенных грибов и вызывать появление аномальных инфекционных структур. Например, подавление апрессориального развития происходило у некротрофного гриба *Cochliobolus miyabeanus* при обработке метилглиоксаль бис-гуанилгидразоном, ингибитором синтеза полиаминов [15].

В наших экспериментах при воздействии перекисью водорода и 3-АТА происходило замедление роста мучнисторосяного патогена. В обоих случаях наблюдали появление конидий с большим количеством ростковых трубок — аномалии, которые редко встречаются у контрольных растений. Вместе с тем при использовании 3-АТА происходило нехарактерное для перекиси водорода образование

множества зачатков гиф при высоких концентрациях и утолщенных коротких гиф при низких концентрациях. При использовании перекиси водорода даже в достаточно высоких концентрациях, полностью или почти полностью ингибирующих развитие колоний, наблюдали большое количество апрессориев внешне нормальной морфологии.

Таким образом, особенности взаимного распознавания растения и патогена могут проявляться уже на ранней стадии взаимодействия. Предпринятые нами исследования показали, что некоторые черты воздействия на мучнисторосяной патоген, характерные для перекиси водорода или общие для перекиси водорода и 3-АТА, а именно, появление аномально длинных апрессориев или ростковых трубок, характерны также для развития данного патогена на листьях устойчивых растений [16]. Количество апрессориев с нормальной морфологией коррелирует с плотностью колоний возбудителя мучнистой росы. Это свидетельствует о том, что нарушение дифференциации инфекционных структур приводит к снижению точек контакта с растением и при аномалиях ростковых трубок происходит дальнейший поиск мест новых контактов, при этом проникновение в эпидермальную клетку растения-хозяина и образование гаустории не происходят. Полученные нами данные позволяют предположить, что причиной аномального развития мучнисторосяного патогена на листьях пшеницы может быть воздействие АФК, возникающих в устойчивом растении при прохождении защитных реакций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huckelhoven R., Fodor J., Preis C., Kogel K.H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation // *Plant Physiol.* 1999. Vol. 119. N 4. P. 1251–1260.
2. Trujillo M., Altschmied L., Schweizer P., Kogel K.H., Huckelhoven R. Respiratory burst oxidase homologue A of barley contributes to penetration by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* // *J. Exp. Bot.* 2006. Vol. 57. N 14. P. 3781–3791.
3. Huckelhoven R. Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. Vol. 245. N 1. P. 9–17.
4. Шкаликов В.А., Дьяков Ю.Т., Смирнов А.Н., Джалилов Ф.С.-У., Стройков Ю.М., Коновалов Ю.Б., Гриценко В.В. Иммуниетет растений. Москва: КолосС, 2005. 190 с.
5. Kunoh H., Kunoh K., Ishizaki H. Cytological studies of the early stages of powdery mildew in barley and wheat. XI. Autofluorescence and galos at penetration sites of appressoria of *Erysiphe graminis hordei* and *Erysiphe pisi* on barley coleoptiles // *Can. J. Bot.* 1985. Vol. 63. N 9. P. 1535–1539.
6. Шервуд Р.Т., Вэнс К.П. Первичные изменения в клетках эпидермиса при проникании паразита // *Инфекционные болезни растений: физиологические и биохимические основы* / Под ред. Ю.Т. Дьякова. М.: Агропромиздат, 1985. С. 34–53.
7. Vanacker H., Carver T.L.W., Foyer C.H. Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction // *Plant Physiology.* 2000. Vol. 123. N 4. P. 1289–1300.
8. Walters D., Cowley T., Mitchell A. Methyl jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. N 369. P. 747–756.
9. Feng H., Li X., Duan J., Li H., Liang H. Chilling tolerance of wheat seedlings is related to an enhanced alternative respiratory pathway // *Crop Sci.* 2008. Vol. 48. N 6. P. 2381–2388.
10. Shetty N.P., Lyngs Jrgensen H.J., Jensen J.D., Collinge D.B., Shetty H.S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens // *Eur. J. Plant Pathol.* 2008. Vol. 121. N 3. P. 267–280.
11. Perez F.J., Rubio S.N. An improved chemiluminescence method for hydrogen peroxide determination in plant tissues // *Plant Growth Regul.* 2006. Vol. 48. N 1. P. 89–95.
12. Аветисян Г.А. Цитофизиологические особенности ранних стадий развития возбудителя мучнистой росы пшеницы при моделировании окислительного стресса: дисс. канд. биол. наук. Москва, 2011. 130 с.

13. Hüeckelhoven R., Dechert C., Kogel K.-H. Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003. Vol. 100. N 9. P. 5555–5560.

14. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Общество фитопатологов, 2001. 301 с.

15. Ahn I.-P. Glufosinate ammonium-induced pathogen inhibition and defense responses culminate in disease protection in bar-transgenic rice // Plant Physiology. 2008. Vol. 146. N 1. P. 213–227.

16. Мишина Г.Н., Серезкина Г.В., Аветисян Т.В., Рябченко А.С., Андреев Л.Н. Особенности формирования гало в процессе патогенеза как ответная реакция эпидермальных клеток злаков на проникновение возбудителей мучнистой росы // Изв. РАН. Сер. биол. 2001. № 4. С. 424–430.

Поступила в редакцию  
16.02.2017

Принята в печать  
06.03.2017

## MYCOLOGY AND ALGOLOGY

### ANOMALIES OF THE EARLY STAGES OF DEVELOPMENT OF *ERYSIPHE GRAMINIS TRITICI* UNDER OXIDATIVE STRESS

G.A. Avetisyan\*, T.V. Avetisyan

N.V. Tsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences,  
Russian, 127276, Moscow, Botanicheskaya ul., 4

\*e-mail: avetisyang@yandex.ru

We report on investigation of early stage interactions between powdery mildew pathogen and host plant. We demonstrated that treatment of wheat leaves with various concentrations of hydrogen peroxide and 3-amino-1,2,4-triazole resulted in formation of morphological anomalies of germ tubes and non-viable colonies on host plant leaves. The observed effect of oxidative stress on germination anomalies of powdery mildew is similar to previously reported interactions between the pathogen and mildew resistant plants. Based on this work we conclude that abnormal infectious structure formation of wheat powdery mildew may be associated with increased presence of reactive oxygen species during plant defense responses.

**Key words:** active oxygen species, powdery mildew pathogen, infectious structures, hydrogen peroxide, 3-amino-1,2,4-triazole, wheat, oxidative stress

#### Сведения об авторах

Аветисян Гаянэ Акоповна — канд. биол. наук, науч. сотр. Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-495-977-80-00; e-mail: avetisyang@yandex.ru

Аветисян Тамара Владимировна — мл. науч. сотр. Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-495-977-80-00; e-mail: tarverdiantv@yandex.ru

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.218

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ВЕКТОРОВ РАЗЛИЧНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ЭКСПРЕССИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ IgA1-ИЗОТИПА

В.В. Аргентова<sup>1, \*</sup>, Т.К. Алиев<sup>3</sup>, В.А. Топорова<sup>4</sup>, В.С. Рыбченко<sup>2</sup>,  
Д.А. Долгих<sup>4</sup>, М.П. Кирпичников<sup>1</sup><sup>1</sup>Кафедра биоинженерии и <sup>2</sup>кафедра биохимии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>3</sup>кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3;

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

\*e-mail: vicarg@rambler.ru

Терапевтические препараты антител по применению и производству занимают на мировом фармацевтическом рынке второе место после вакцин. Наиболее распространенными терапевтическими антителами являются моноклональные антитела (МАт) IgG-изотипа, продуцируемые в эукариотических клетках CHO. В последнее время значительный интерес вызывает возможность разработки терапевтических препаратов на основе антител IgA-изотипа, способных проявлять широкий спектр эффекторных функций на слизистых оболочках человека. Для исследования уровня экспрессии иммуноглобулинов А (IgA) в клетках млекопитающих был сконструирован набор бипромоторных (CMV, EF1 $\alpha$ ) векторов, содержащих варибельные области тяжелой и легкой цепей человеческого антитела F1b $\nu$ 3 против гемагглютинаина вируса гриппа А, константные домены IgA1 тяжелой и легкой (каппа-типа) цепей антитела человека. Полученные экспрессионные векторы отличались друг от друга различной ориентацией промоторов, а также наличием или отсутствием интронов. Два варианта полноразмерных тяжелых и легких цепей были клонированы в экспрессионный вектор в однонаправленной и разнонаправленной ориентациях. Полученными плазмидами трансфицировали клетки CHO-DG44 и НЕК-293Т. Уровень продукции антител был определен при помощи иммуоферментного анализа для стабильной трансфекции клеток CHO-DG44 и НЕК-293Т. Результаты экспериментов свидетельствуют о существенном увеличении продукции антител F1b $\nu$ 3-IgA1 при трансфекции эукариотических клеток плазмидой pBIPr-ABIgA1F16-Iht с интронами в тяжелой цепи IgA1 и с однонаправленной ориентацией промоторов.

**Ключевые слова:** бипромоторный вектор, вирус гриппа А, интроны, ориентация промоторов, эукариотическая экспрессия, моноклональные антитела IgA1

В последнее время иммунотерапия с использованием рекомбинантных антител становится всё более распространенной. Методы продукции и очистки антител человека изотипа IgG1 хорошо изучены и широко применяются, однако в последние годы увеличивается внимание и к применению антител изотипа IgA в связи с их высоким потенциалом для терапии инфекционных и опухолевых заболеваний [1].

Хотя функционально IgA сходен с IgG, основной функцией IgA является защита слизистых оболочек дыхательной, пищеварительной и мочеполовой систем. Молекулярная структура мономерного IgA (гетеротетрамер H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>) близка к строению антител других изотипов [2]. В сыворотке крови антитела изотипа IgA преимущественно мономерны,

однако на слизистых оболочках функционируют как димеры, образуемые за счёт дисульфидных связей на С-концах тяжелых цепей, J-цепи и секреторного компонента. Антитела IgA имеют оба сайта N- и O-гликозилирования [3], что накладывает некоторые ограничения на выбор систем для их продукции

Важным представляется тот факт, что именно димерные IgA-антитела выполняют особые эффекторные функции, что выгодно отличает их от мономерных форм IgA и IgG.

Антитела IgA связываются с другим набором клеточных рецепторов по сравнению с антителами IgG и поэтому их фармакокинетика выгодно отличается от таковой для IgG [4]. Было показано, что антитела IgA обладают более выраженной спо-

способностью, чем антитела IgG, уменьшать образование вирусных бляшек с гетерологичными подтипами вирусов гриппа. Это подтверждает разницу в антивирусном потенциале IgA и IgG [5]. Ранее было показано, что IgA может очень эффективно нейтрализовать вирусы в вирус-инфицированных секреторных эпителиальных клетках. Поэтому выраженное участие IgA-антител в иммунном ответе может быть особенно важным в случае высокопатогенных штаммов, когда наибольшие осложнения связаны с неконтролируемыми воспалительными реакциями [6, 7].

Однако, несмотря на уникальные характеристики и терапевтический потенциал, антитела IgA исследованы не очень подробно. Основными проблемами, затрудняющими работу с ними, являются недостаточная разработанность методов биосинтеза и очистки, а также трудности с получением достаточного количества рекомбинантных антител для исследований *in vivo*. Если необходимый для клинических исследований уровень антител IgG человека обычно достигается в стандартно разработанных экспрессионных системах клеток млекопитающих, в которых добиваются посттрансляционных модификаций и типов гликозилирования, свойственных антителам человека, то для IgA отсутствует единый подход к конструированию системы их экспрессии. В связи с этим большое практическое значение приобретает оптимизация стандартных методов продукции IgA. К сожалению, большинство предыдущих работ по изучению влияния конструкций векторов на экспрессию в клетках млекопитающих было проведено для IgG. Так, одним из аспектов исследования было изучение регулируемой экспрессии тяжёлой и лёгкой цепей IgG. Трансфекция эукариотических клеток двумя независимыми плазмидами, содержащими одну из цепей, выявила выраженную зависимость экспрессии от сайта интеграции [8], что влияло на соотношение тяжёлой и лёгкой цепей при экспрессии. Известно, что для стабильной экспрессии в клетках СНО экспрессионный вектор должен обеспечивать соотношение “тяжёлая цепь : лёгкая цепь” менее чем 1:2, что делает возможным получение большой фракции клеточных клонов с высоким уровнем экспрессии моноклональных антител [9]. Более эффективным для продукции IgG в клетках млекопитающих оказался вектор, содержащий бицистронную конструкцию [10, 11]. Был изучен уровень продукции рекомбинантного IgG при различном дизайне экспрессионных векторов при транзientной и стабильной экспрессии в клетках НЕК-293Т, СНО-K1(13) и СНО-DG44 [12–15].

Одним из преимуществ использования антител IgA в качестве терапевтического средства против гриппа является их мукозальное применение. Ранее было выделено моноклональное антитело F16, узнающее гемагглютинин всех 16 серотипов и нейтрализующее группы 1 и 2 вируса гриппа А [16].

Получение терапевтических средств на основе IgA-антител требует разработки стабильных высокопродуктивных клеточных линий. В связи с этим получение новых оптимизированных конструкций экспрессионных векторов и исследование их влияния на продуктивность рекомбинантных IgA-антител имеют важное значение. Цель настоящей работы заключалась в усовершенствовании эукариотического вектора для повышения уровня экспрессии IgA на основе переменных доменов антитела F16 к гемагглютинину вируса гриппа А в клетках млекопитающих. В задачи исследования также входило выяснение влияния наличия интронов в области константного домена тяжёлой цепи на уровень продукции рекомбинантных антител при трансфекции эукариотических клеток соответствующим вектором.

### Материалы и методы

Создание экспрессионных плазмид для продукции рекомбинантных антител в клетках млекопитающих. Для получения гена лёгкой цепи антитела F16v3 [16] с секреторным пептидом антитела F10 [17] с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице плазмиды pOpti-F10L-MluI [18] получали фрагменты, содержащие последовательности секреторного пептида F10L и константного домена легкой каппа-цепи [17–19]. Аналогично на матрице ранее сконструированной плазмиды pTrc99A-stIIIF16LH [20] получали фрагмент, содержащий последовательность переменного домена антитела F16v3. Последовательности объединяли с помощью метода ПЦР с использованием коротких перекрывающихся последовательностей (SOE-PCR), результирующий фрагмент обрабатывали рестриктазами NheI и XhoI и клонировали по данным сайтам в экспрессионный вектор pOpti-F10L-MluI [18], полученный на основе pOptiVEC™-ТОРО® (Invitrogen).

Для получения гена переменной области тяжёлой цепи F16v3 с секреторным пептидом F10H на матрице плазмид pTrc99A-stIIIF16LH [20] и pcDNA3.3-H [18] получали фрагменты, содержащие кодирующие последовательности переменного домена тяжёлой цепи F16v3 и секреторного пептида F10H [17], соответственно, после чего состыковали последовательности с помощью метода ПЦР с удлинённым перекрытием (SOE-PCR). Полученный фрагмент обрабатывали рестриктазами NheI и Bsp120I, клонировали в плазмиду pcDNA3.3-H [18] и секвенировали, получая таким образом плазмиду pcDNA3.3-F16HG1.

На матрице геномной ДНК человека с помощью ПЦР получали фрагменты, содержащие отдельные экзоны IgA1, которые клонировали в pAL-TA (Евроген, Россия), и секвенировали. Для получения кодирующей последовательности изотипа IgA1 с помощью ПЦР на матрице полученных клонов отдельно синтезировали последовательности каж-

дого из трёх экзонов IgA1. Полученные фрагменты объединяли с помощью метода ПЦР с удлинённым перекрытием. Одновременно удаляли сайт рестрикции XhoI во втором экзоне гена с помощью сайт-направленного мутагенеза. Результирующий фрагмент обрабатывали рестриктазами SacI и XhoI. Затем полученный фрагмент совместно с фрагментом NheI-Bsp120I из плазмиды pсDNA3.3-FI6HG1 клонировали по сайтам узнавания рестриктаз NheI и XhoI в промежуточный вектор pSK+/hEF1-HTLV-BGH [18], содержащий гибридный промотор hEF1-HTLV и сайт полиаденилирования BGH, получая плазмиду pSK-EF1-FI6HA1-BGH. Фрагмент MluI-MluI из плазмиды pSK-EF1-FI6HA1-BGH, содержащий ген тяжёлой цепи антитела FI6 изотипа IgA1 с секреторным пептидом F10, был поставлен под контроль промотора hEF1-HTLV и содержал сайт полиаденилирования BGH. В результате данного клонирования были получены две разные конструкции, отличающиеся по типу ориентаций – с однонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-ht,) и разнонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-hh) транскрипцией генов тяжёлой и лёгкой цепей антитела. Далее в тексте однонаправленная ориентация промоторов (ht) обозначается как “голова-хвост”, а разнонаправленная (hh) – “голова-голова”. Схематическое изображение плазмид приведено на рис. 1 А, Б.

Кодирующую последовательность константных доменов гена IgA, состоящую из экзонов, разделённых двумя интронами, получали в два этапа. На первом этапе, используя геномную ДНК человека в качестве матрицы, получали два фрагмента с помощью ПЦР с праймерами для удаления сайта рестрикции XhoI во втором экзоне IgA1 и праймерами, ограничивающими нуклеотидную последовательность константных доменов IgA1, которые клонировали в pAL-TA (Евроген, Россия) и секвенировали. На втором этапе на матрице клонов с помощью ПЦР с теми же праймерами получали два фрагмента с одновременным удалением сайта рестрикции XhoI во втором экзоне гена, фрагменты объединяли с использованием метода ПЦР с удлинённым перекрытием. Клонирование проводили аналогично схеме для кодирующей последовательности IgA1 без интронов (см. выше). В результате также было получено две разные конструкции, отличающиеся по типу ориентации – с однонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-Iht) и разнонаправленной (pBiPr-ABiGAI1F16-Ihh) транскрипцией генов тяжёлой и лёгкой це-

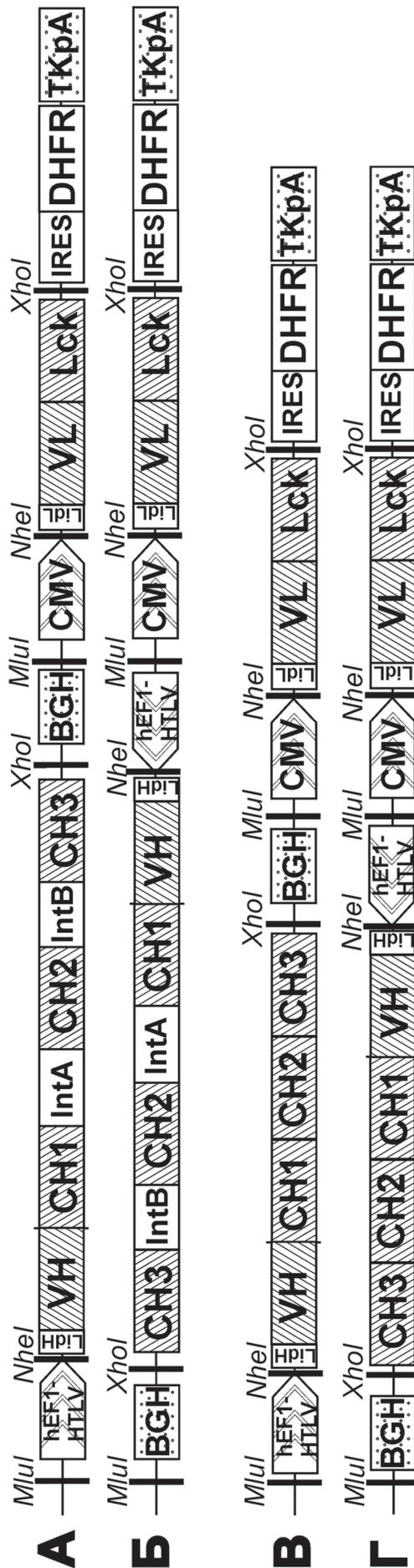
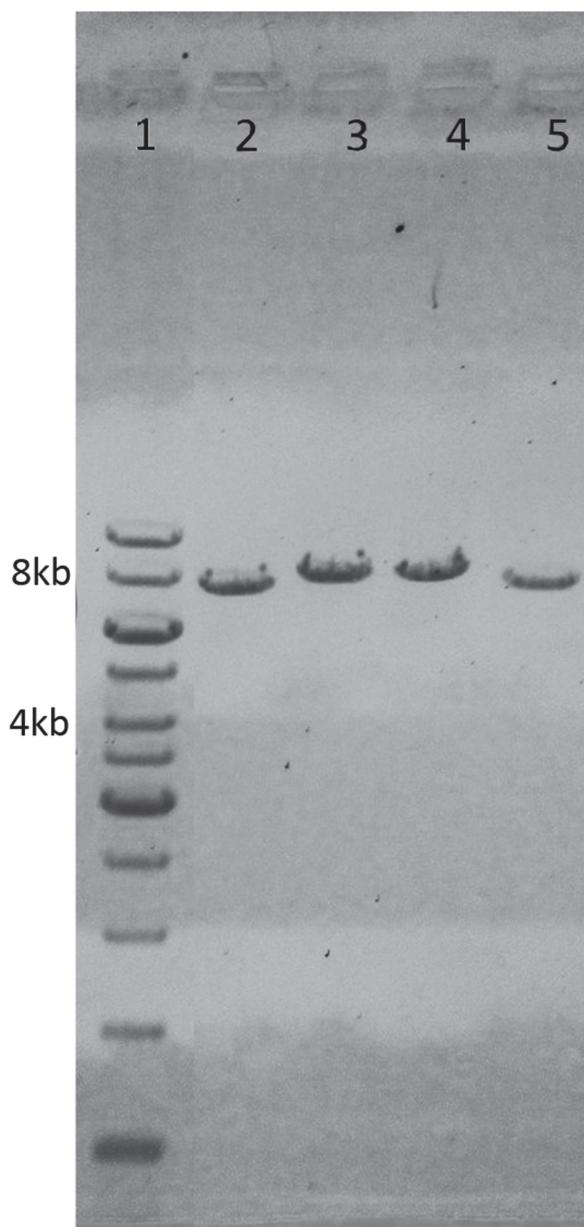


Рис. 1. Структура экспрессионных плазмид IgA1. А - плазмиды pBiPr-ABiGAI1F16-hh; Б - плазмиды pBiPr-ABiGAI1F16-ht; В - плазмиды pBiPr-ABiGAI1F16-Ihh; Г - плазмиды pBiPr-ABiGAI1F16-Iht. Условные обозначения: P<sub>CMV</sub> – промотор/энхансер ранних генов цитомегаловируса человека; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокарита (EMCV); DHFR – ген дигидрофолагредуктазы; TK pA – сигнал полиаденилирования тимидинкиназы вируса герпеса; IidL – кодирующая последовательность секреторного пептида легкой цепи антитела F10; VL – кодирующая последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела F16 к гематоглотину вируса гриппа А; Lck – кодирующая последовательность константного домена kappa легкой цепи антитела человека; VH – кодирующая последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела F16 к гематоглотину вируса гриппа А; IidH – кодирующая последовательность секреторного пептида тяжелой цепи антитела F10; HC – кодирующая последовательность константных доменов IgA1; IntA, IntB – интроны гена IgA1; hEF1-HTLV – гибридный промотор, состоящий из промотора фактора элонгации EF-1a и 5'-нетранслируемой области вируса Т-клеточной лейкемии человека (HTLV); BGH pA – сайт полиаденилирования и терминатор гена бычьего гормона роста BGH; MluI, NheI, XhoI – сайты узнавания соответствующих эндонуклеаз рестрикции

пей антитела. Схематическое изображение плазмид приведено на рис. 1 В, Г.

Получение препаратов плазмидной ДНК для трансфекции. Плазмидную ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* штамма Nova Blue (DE3) (Novagen, США) и выделяли с помощью набора “Plasmid Miniprep” (Евроген, Россия). Концентрацию полученной плазмиды определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 260 нм на приборе “Implen NanoPhotometer® P200” (Implen GmbH, Германия). Чистоту и линейность плазмиды определяли с помощью электрофореза в 0,6%-ном агарозном геле (рис. 2). Плазмидную ДНК линеаризовали с помощью рестриктазы PstI (НПО “СибЭнзим”, Россия).



**Рис. 2.** Электрофореграмма линеаризованных экспрессионных плазмид. 1 – маркер молекулярных масс (O’GeneRuler 1kb DNA ladder Fermentas, 250 bp – 10kb), 2 – плаزمида pBiPr-ABlgA1F16-hh, 3 – плазмида pBiPr-ABlgA1F16-Iht, 4 – плазмида pBiPr-ABlgA1F16-Ihh, 5 – плазмида pBiPr-ABlgA1F16-ht

Трансфекция. Клетки CHO-DG44 (dhfr-) (Thermo Fisher Scientific, США) выращивали с использованием стандартной среды IMDM (Iscove’s Modified Dulbecco’s Medium, Gibco, США) с использованием 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HI FBS, Gibco, США), а клетки HEK-293T – на среде DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium, Gibco, США) с использованием 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HI FBS, Gibco, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 96%-ной влажности, 37°C и 8% CO<sub>2</sub>.

Для стабильной трансфекции исходные клетки, достигшие ≥90% сомкнутого монослоя, высевали в количестве 400 000 клеток/лунку. Измерение концентрации клеток и их жизнеспособности проводилось с использованием 0,04%-ного раствора трипанового синего (Gibco, США) в камере Горяева. Клетки выращивали в 6-луночных планшетах (Greiner Bio-One, Германия) по достижению ими 80–90% сомкнутого монослоя. Трансфекцию исходных клеток проводили с применением трансфицирующего реагента Lipofectamine-3000 Transfection Kit (Invitrogen, США) по стандартному протоколу, представленному производителем. Клетки, в которые добавляли реагент Lipofectamine-3000 при отсутствии плазмидной ДНК, являлись отрицательным контролем на каждом планшете. Трансфекция проводилась четырьмя вариантами плазмид: pBiPr-ABlgA1F16-hh, pBiPr-ABlgA1F16-Iht, pBiPr-ABlgA1F16-Ihh, pBiPr-ABlgA1F16-ht (рис. 1).

После проведения трансфекции клетки инкубировали в течение 72 ч. Во временные интервалы 24, 48 и 72 ч (для определения наиболее эффективного времени после трансфекции) были взяты пробы для иммуноферментного анализа (ИФА).

Иммуноферментный анализ. Экспрессию IgA определяли методом непрямого ИФА. На 96-луночные планшеты в качестве антигена наносились моноклональные антитела мыши к каппа-домену лёгкой цепи иммуноглобулинов человека (Биалекса, Россия) в количестве 0,5 мкг/лунку. При проведении анализа использовали Anti-Human IgA (a-chain specific) (Sigma, США), конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве стандарта использовали IgA из сыворотки человека (Sigma, США).

### Результаты и обсуждение

Для экспрессии рекомбинантного IgA были сконструированы экспрессионные бипромоторные плазмиды: pBiPr-ABlgA1F16-hh, pBiPr-ABlgA1F16-ht, pBiPr-ABlgA1F16-Ihh, pBiPr-ABlgA1F16-Iht. В ходе конструирования ген лёгкой цепи был поставлен под контроль промотора CMV и сигнала полиаденилирования ТКрА, ген тяжёлой цепи – под контроль рекомбинантного промотора HEF1-HTLV и сигнала полиаденилирования ВGH. Присутствие лидерных пептидов на N-концевых частях лёгкой и тяжёлой цепей позволяло осуществлять секрецию иммуноглобулина непосредственно в культу-

ральную среду. В ходе клонирования тяжёлой цепи в экспрессионный вектор по сайту MluI были получены два типа ориентации (рис. 1): с однонаправленной (ht) и разнонаправленной (hh) транскрипцией. Для осуществления селекции трансфицированных клеток в средах без гипоксантина и тимидина экспрессионный вектор содержал ген дигидрофолат-редуктазы (ДФР). Данный ген располагался на мРНК лёгкой цепи на расстоянии 650 п.н. от гена лёгкой цепи по ходу транскрипции. Трансляция гена ДФР обеспечивалась с помощью IRES-элемента, который располагался против хода транскрипции гена ДФР.

Наряду с влиянием ориентации промоторов было также изучено влияние интронов в константном домене IgA на экспрессию антител. Для сравнения полученных плазмидных конструкций были использованы два вида эукариотических клеток: CHO-DG44 — как наиболее часто используемые при получении терапевтических антител, а также клетки человека линии HEK-293T. Использование HEK-293T было обусловлено тем, что процесс гликозилирования в клетках человека отличен от такового в клетках китайского хомячка. Так, было показано, что клетки CHO продуцируют гликан преимущественно трёхветвистой структуры, тогда как сывороточный IgA человека обладает в основном двухветвистой структурой, что приводит к разнице в продуцировании IgA [15].

Результаты ИФА для проб, отобранных через 24, 48 и 72 ч (рис. 3), показали преимущество экспрессии в клетках HEK-293T по сравнению с экспрессией в CHO-DG44 в случае трансфекции серией плазмид, не содержащих интроны в константных регионах IgA1. При этом, если при трансфекции плазмидой с ориентацией направления транскрипции “голова-голова” разница между двумя типами клеток была незначительна, для ориентации “голова-хвост” уровень экспрессии в клетках HEK-293T оказался в 2 раза большим, чем в клетках CHO-DG44. Однако наилучший уровень экспрессии антител был получен при трансфекции плазмидой с ориентацией направления транскрипции “голова-хвост” как для CHO-DG44, так и для HEK-293T. Результаты по экспрессии антител, полученные при трансфекции плазмидами, содержащими интроны в области константных доменов IgA1, также продемонстрировали, что максимальный уровень достигается для варианта “голова-хвост” при экспрес-

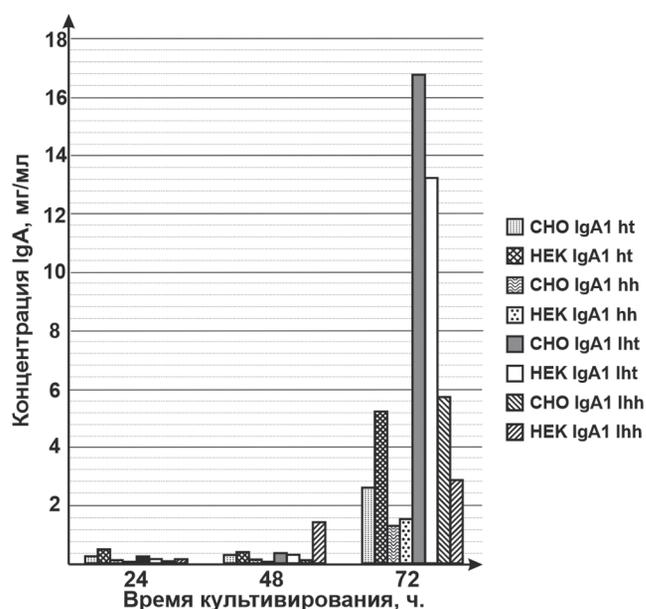


Рис. 3. Концентрация антител IgA1 в культуральной среде после трансфекции клеток CHO-DG44 и HEK-293T различными конструкциями плазмид через 24, 48 и 72 ч. Определение концентрации антител IgA1 в культуральной среде осуществляли методом ИФА

сии в обеих клеточных линиях. При этом, если уровень экспрессии антител при трансфекции плазмидой с разнонаправленной ориентацией в клетках китайского хомячка составил 5,5 мг/л, то для варианта с однонаправленной транскрипцией — 17 мг/л. Таким образом, уровень экспрессии антител во втором случае был выше в 3 раза.

Результаты экспериментов показали, что для обоих типов клеток наблюдаются одинаковые закономерности влияния направления промоторов и наличия интронов на уровень биосинтеза антител изотипа IgA1. При этом максимальные результаты продемонстрировал вариант трансфекции экспрессионной плазмидой, содержащей интроны и однонаправленную ориентацию транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии (Соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beyer T., Lohse S., Berger S., Peipp M., Valerius T., Dechant M. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies // *J. Immunol. Methods*. 2009. Vol. 346. N 1–2. P. 26–37.
2. Woof J.M., Kerr M.A. The function of immunoglobulin A in immunity // *J. Pathol.* 2006. Vol. 208. N 2. P. 270–282.
3. Woof J.M., Russell M.W. Structure and function relationships in IgA // *Mucosal Immunol.* 2011. Vol. 4. N 6. P. 590–597.

4. Lohse S., Derer S., Beyer T., Klauz K., Peipp M., Leusen J.H.W., Van de Winkel J.G.J., Dechant M., Valerius T. Recombinant dimeric IgA epidermal growth factor receptor mediate effective tumor cell killing // *J. Immunol.* 2011. Vol. 18. N 6. P.3770–3778.
5. Muramatsu M., Yoshida R., Miamoto H., Tomabechi D., Masahiro K. Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization

with inactivated influenza viruses in mice // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N 8. e71534.

6. Van Riet E., Ainaï A, Suzuki T., Hasegawa H. Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design // *Vaccine*. 2012. Vol. 30. N 40. P. 5893–5959.

7. Blutt S.E., Miller A.D., Salmon L., Metzger D.W., Conner M.E. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection // *Mucosal Immunol*. 2012. Vol. 5. N 6. P. 712–719.

8. Corti D., Voss J., Gamblin S. J., et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binding to group1 and group2 influenza A hemagglutinin // *Science*. 2011. Vol. 33. N 6044. P. 850–856.

9. Wurm F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // *Nat. Biotechnol*. 2004. Vol. 22. N.11. P. 1393–1398.

10. Schlatter S., Stansfield S.H., Dinnis D.M., Racher A.J., Birch J.R., James D.C. On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells // *Biotechnol. Prog.* 2005. Vol. 21. N.1. P. 122–133.

11. Jostock T., Vanhove M., Brepoels E., van Gool R., Daukandt M., Wehnert A., van Hegelsom R., Dransfield D., Sexton D., Devlin M., Ley A., Hoogenboom H.R., Müllberg J. Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab on-phage display libraries // *J. Immunol. Methods*. 2004. Vol. 289. N. 1–2. P. 65–80.

12. Li J., Menzel C., Meier D., Zhang C., Dübel S., Jostock T. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies // *J. Immunol. Methods*. 2007. Vol. 318. N 1–2. P. 113–124.

13. Chusainov J., Yang Y.S., Yeo J.H.M., Toh P.C., Asvadi P., Wong N.S., Yap M.G. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: What makes a stable high producer? // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. Vol. 102. N 4. P. 1182–1194.

14. Van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Haegeman G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. N 18. P. 5665–5678.

15. Bout A., Halford D., Jones A. Efficient production of IgA in recombinant mammalian cells. Patent EP1508576A1, 2005.

16. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binding to group1 and group2 influenza A hemagglutinin // *Science*. 2011. Vol. 333. N 6044. P. 850–856.

17. Radko B.V., Boitchenko V.E., Nedospasov S.A., Korobko V.G. Characterization of the genes encoding variable light and heavy chains of the high-affinity monoclonal antibody against human tumor necrosis factor // *Russ. J. Immunol.* 2002. Vol. 7. N 4. P. 371–374.

18. Алиев Т.К., Балабашин Д.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Панина А.А., Топорова В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая химерное антитело против фактора некроза опухоли-альфа человека, линия эукариотических клеток — продуцент химерного антитела и способ получения химерного антитела. Патент № 2555533, Россия, 23.05.2013.

19. Balabashin D., Kovalenko E., Toporova V., Aliev T., Panina A., Svirshchevskaya E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. Production of anti tnf- $\alpha$  antibodies in eukaryotic cells using different combinations of vectors carrying heavy and light chains // *Cytotechnology*. 2015. Vol. 67. N 5. P. 761–772.

20. Aliev T.K., Dement'yeva I.G., Bokov M.N., Pozdnyakova L.P., Sveshnikov P.G., Toporova V.A., Rybchenko V.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Development and properties of recombinant proteins based on the broadly neutralizing antibody to influenza A virus // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol.71. N 2. P. 87–92.

Поступила в редакцию  
12.12.2016

Принята к печати  
02.03.2017

## MOLECULAR BIOLOGY

### STUDIES OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT EUKARYOTIC VECTORS' DESIGN ON THE EXPRESSION OF RECOMBINANT ANTIBODY IgA1 ISOTYPE

V.V. Argentova<sup>1,\*</sup>, T.K. Aliev<sup>3</sup>, V.A. Toporova<sup>4</sup>, V.S. Rybchenko<sup>2</sup>, D.A. Dolgikh<sup>4</sup>, M.P. Kirpichnikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioengineering and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>3</sup>Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–3, Moscow, 119234, Russia;

<sup>4</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia

\*e-mail: vicarg@rambler.ru

Production and application of therapeutic monoclonal antibodies take second place in the global pharmaceutical market after vaccines. Nowadays the IgG1 is one of the prevailing monoclonal antibodies type for the therapeutic use that are produced in CHO cells. Recently the possibility of developing therapeutic drugs based on antibodies of IgA-isotype has demonstrated a broad range of effector functions on human mucous membranes, which has caused a significant interest in this research field. In our research about level of IgA1 antibody expression in mammalian cells, we designed a set of bipromoter (CMV, EF1 $\alpha$ ) vectors containing variable regions of heavy chain (VH) and light chain (VL) genes from human monoclonal antibody FI6v3 against influenza A virus, constant regions IgA1 of heavy and light chains of human antibody (with or without introns). The vectors differed in mutual orientation of promoters and presence or lack of introns. Two versions of the full-length light and heavy chains were cloned in eukaryotic expressing vector in “head-head”/ “head-tail” orientations and then transfected into HEK-293T and CHO/dhfr-

cells. The level of antibody production was determined using ELISA test for transfection of CHO DG44 and HEK-293T cell culture. The results of the experiments showed a significant increase in the production of FI6v3-IgA1 antibodies when eukaryotic cells were transfected with a plasmid pBiPr-ABIgA1FI6-Iht containing introns in constant regions of IgA1 and with orientation of transcription in the “head-tail” direction.

**Key words:** *Bi-promoter vector, influenza A virus, introns, promoters of different orientation, eukaryotic expression, monoclonal antibody IgA1*

#### **Сведения об авторах**

*Аргентова Виктория Витальевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vicarg@rambler.ru

*Алиев Теймур Кантамирович* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: ta12345@list.ru

*Топорова Виктория Александровна* – мл. науч. сотр. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: rhuta@rambler.ru

*Рыбченко Владислав Сергеевич* – студент биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: vladislavrusia@yandex.ru

*Долгих Дмитрий Александрович* – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-80-11; e-mail: dolgikh@nmr.ru

*Кирпичников Михаил Петрович* – академик РАН, проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.322

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТЕТРАМЕРИЗАЦИОННОГО ДОМЕНА КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv10.2 ЧЕЛОВЕКА В РАЗЛИЧНЫХ ОЛИГОМЕРНЫХ СОСТОЯНИЯХ

В.Н. Новоселецкий\*, А.Д. Волынцева, К.В. Шайтан, О.С. Соколова

Кафедра биоинженерии, биологический факультет,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: valeryns@gmail.com

Потенциал-управляемый калиевый канал Kv10.2 экспрессируется в нервной системе, однако его функции и участие в развитии болезней человека остаются мало изученными. Мутации канала Kv10.2 были обнаружены при эпилептической энцефалопатии и аутизме. Моделирование пространственной структуры канала является важным инструментом для получения информации о молекулярных аспектах его функционирования и механизмах, ответственных за патогенез. В настоящей работе выполнено молекулярное моделирование спирального фрагмента С-концевого домена канала Kv10.2 человека (hEAG2) в димерной, тримерной и тетрамерной формах. Стабильность всех форм подтверждена расчётами методом молекулярной динамики. Выявлены контакты и взаимодействия, стабилизирующие структуру.

**Ключевые слова:** потенциал-управляемый калиевый канал Kv10.2, олигомеризация, лейциновая застёжка, суперспираль, молекулярное моделирование, молекулярная динамика

Потенциал-управляемые калиевые каналы контролируют перенос ионов  $K^+$  через клеточную мембрану и играют ключевую роль в возбудимых и невозбудимых клетках. Канал Kv10.2 (кодируемый геном *KCNH5*) принадлежит семейству ether-a-go-go (EAG) и экспрессируется в нервной системе [1].

Мутации каналов семейства EAG вызывают нарушение синаптической пластичности и памяти [2]. Нарушения функционирования канала Kv10.2 наблюдались при развитии эпилептической энцефалопатии и аутистических расстройствах [3], а также в процессе возникновения и развития опухолей [2]. Несмотря на предпринятые попытки исследования канала Kv10.2, его функционирование в нервной системе и вовлеченность в развитие заболеваний человека остаются недостаточно изученными [3, 4].

Анализ гена *KCNH5*, клонированного незадолго до завершения проекта “Геном человека” [5, 6], показал, что канал Kv10.2 обладает топологией, сходной с другими калиевыми потенциал-управляемыми каналами (Kv): шесть трансмембранных спиралей в каждой из четырёх субъединиц. Структура цитоплазматического домена потенциал-управляемых каналов сильно варьирует между различными семействами [7]. С-концевой домен необходим для корректной сборки тетрамерного канала [8], причём межспиральные взаимодействия определяют не только стабильность, но и селективность мультимеризации [9]. Показано, что С-концевой домен канала Kv7.1, гомологичного семейству EAG, имеет две функциональные части, причём проксимальная половина ответственна за экспрессию, сво-

рачивание и проницаемость канала, а дистальная — за направление сворачивания и специфичность связывания с партнерами [10].

Информация о пространственной структуре мембранных белков, в т.ч. ионных каналов, а также их комплексов с различными лигандами является важным условием для понимания механизмов функционирования этих белков. До недавнего времени структура калиевых каналов семейства EAG была неизвестна, хотя и был предпринят ряд попыток моделирования [3, 11–13]. Теперь же ситуация коренным образом изменилась, поскольку была расшифрована структура большей части гомологичного канала Kv10.1 (EAG1) [14], которая может быть использована для моделирования взаимодействия каналов семейства EAG с блокаторами [15]. В то же время, структура протяженного С-концевого участка канала EAG2 (723–988 а.о.) по-прежнему остается неизвестной. Ранее мы показали, что полноразмерные каналы Kv10.2 образуют кластеры, которые солокализуются с актиновым цитоскелетом [7]. Недавно мы установили, что каналы Kv10.2 с удаленным N-концевым доменом также способны к кластеризации [16]. Логично предположить, что во взаимодействии с актином принимают участие С-концевые фрагменты каналов.

Для того, чтобы понять, как спиральные фрагменты С-концевого домена канала Kv10.2 олигомеризуются в составе полноразмерного канала, мы провели моделирование структуры этого фрагмента в димерной, тримерной и тетрамерной формах. Для анализа стабильности полученных олигомеров

использовали расчёты методом молекулярной динамики (МД), что позволило установить контакты и взаимодействия, стабилизирующие структуру олигомеров. Результаты проведенной работы могут быть использованы для анализа влияния возникающих мутаций на структуру и функционирование канала EAG2.

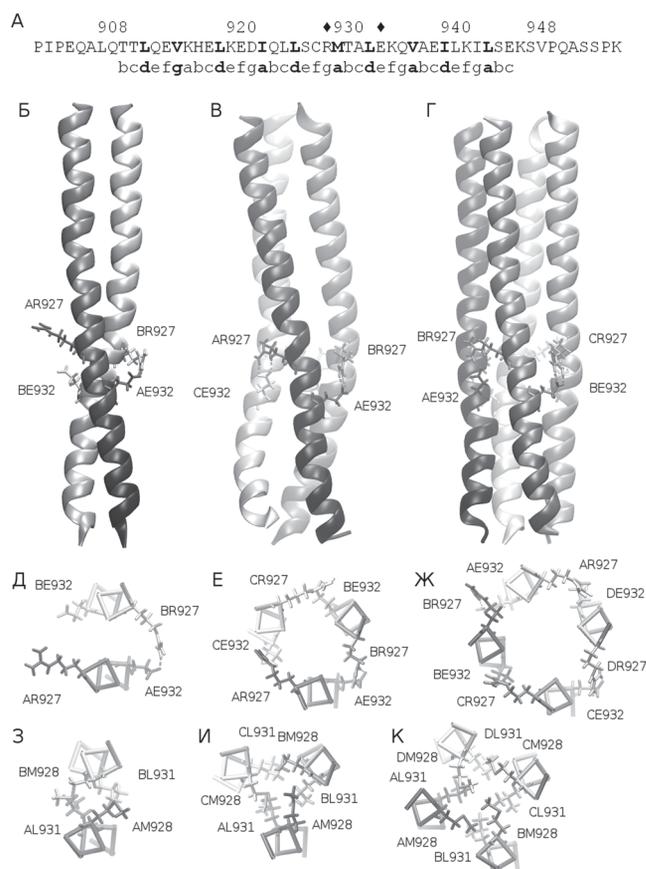
### Материалы и методы

Построение идеальных  $\alpha$ -спиралей, сборка пучков параллельных спиралей и визуализация структур выполнены в программе Maestro (Schrodinger, LLC). Расчёты методом МД выполнены в программе Gromacs [17] с использованием силового поля CHARMM22. Конформеры извлечены из равновесного участка траектории с шагом 100 пс. Для каждого конформера выполнены расчёты параметров суперспиралей с помощью программы TWISTER [18] и энергии взаимодействия с помощью программ APBS [19] и FoldX [20]. Для предсказания олигомерного состояния суперспирали на основе её аминокислотной последовательности использован веб-сервис LOGICOIL [21].

### Результаты и обсуждение

C-концевой спиральный фрагмент внутриклеточного домена канала Kv10.2 (EAG2) содержит пять гептадных повторов, характерных для суперспиралей (рисунок, А). Для анализа степени олигомеризации этого фрагмента мы использовали методы молекулярного моделирования. Структурные модели фрагмента в конформации  $\alpha$ -спирали были построены *de novo*, а затем объединены с образованием димера, тримера и тетрамера. Для полученных моделей была проведена оптимизация и последующий расчёт методом МД в водном растворе в течение 15 нс. Во всех случаях произошло образование стабильных левозакрученных суперспиралей (рисунок, Б, В, Г).

Геометрические параметры суперспиралей являются характеристиками плотности их упаковки и стабильности. Мы сопоставили параметры модельных суперспиралей с параметрами аналогичных суперспиралей, пространственная структура которых известна: димерной формой тропомиозина (pdb-код 3u1a [22]), а также тримерной (pdb-код 3hfе [23]) и тетрамерной (pdb-код 3bj4 [10]) формами C-концевого спирального фрагмента калиевого канала Kv7.1 (табл. 1). Хорошее соответствие радиусов модельных суперспиралей радиусам суперспиралей в экспериментально полученных структурах говорит о достижении плотной упаковки модельных спиралей в процессе расчёта. В то же время такие параметры суперспирали, как шаг и вычисляемое на его основе число остатков на виток, в модельных суперспиралях демонстрируют значительно большие значения по сравнению с экспериментально полученными. Гораздо большим



**Рисунок.** Структура C-концевого спирального фрагмента внутриклеточного домена канала Kv10.2 (hEAG2) (908–948 а.о.). Первичная структура и обозначения остатков по суперспиральному регистру (гидрофобные остатки и соответствующие позиции, преимущественно *a* и *d*, показаны жирным шрифтом) (А). Остатки R и E из мотива R-h-x-h-E (см. текст) отмечены ромбами. Представлены общий вид пространственной структуры (Б, В, Г), ионные и водородные связи остатков Arg927 и Glu932 (Д, Е, Ж) и контакты остатков Met928 и Leu931 (З, И, К) для димерной, тримерной и тетрамерной суперспиралей соответственно. В обозначении остатков первая буква соответствует субъединице

оказывается и разброс этих параметров, причиной которого, по-видимому, является несимметричность отдельных конформеров модельных суперспиралей, вызванная значительной подвижностью суперспиралей в процессе расчёта. Как и в случае с тримерной и тетрамерной формами канала Kv7.1, меньший шаг суперспирали позволяет предположить, что тримерная форма канала Kv10.2 имеет более плотную закрутку вокруг оси суперспирали. Между тем параметры индивидуальных  $\alpha$ -спиралей (число остатков на виток, шаг спиралей и т.п.) во всех моделях являются практически идентичными.

Поддержание стабильности олигомерной структуры суперспиралей обеспечивается большим количеством полярных и ионных взаимодействий и гидрофобных контактов. Последние обусловлены гидрофобными остатками мотива “лейциновой застёжки” (Leu910, Val913, Leu917, Ile921, Leu924, Met928, Leu931, Val935, Leu939, Leu942) (рисунок, А), и их стремление минимизировать свои контакты

Таблица 1

Параметры ряда суперспиралей, рассчитанные с помощью программы TWISTER, и значения энергии взаимодействия (ккал/моль) в олигомерах С-концевого спирального фрагмента канала Kv10.2 в расчёте на одну субъединицу, рассчитанные с помощью программ APBS и FoldX (среднее  $\pm$  стандартное отклонение)

	Димеры		Тримеры		Тетрамеры	
	Kv10.2	Тропомоизин	Kv10.2	Kv7.1	Kv10.2	Kv7.1
Геометрические параметры суперспиралей						
Радиус суперспирали (Å)	5,0 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,6	6,5 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,2
Число остатков на виток суперспирали	90 $\pm$ 80	100 $\pm$ 20	120 $\pm$ 80	85 $\pm$ 12	180 $\pm$ 100	125 $\pm$ 20
Шаг суперспирали (Å)	140 $\pm$ 120	150 $\pm$ 30	180 $\pm$ 120	125 $\pm$ 20	270 $\pm$ 150	181 $\pm$ 20
Геометрические параметры спиралей						
Радиус спирали (Å)	2,27 $\pm$ 0,12	2,29 $\pm$ 0,03	2,3 $\pm$ 0,2	2,29 $\pm$ 0,04	2,28 $\pm$ 0,08	2,30 $\pm$ 0,03
Число остатков на виток спирали	3,65 $\pm$ 0,12	3,62 $\pm$ 0,05	3,7 $\pm$ 0,2	3,62 $\pm$ 0,05	3,66 $\pm$ 0,09	3,61 $\pm$ 0,05
Значения энергии в расчёте на одну субъединицу						
APBS	-22 $\pm$ 10		-39 $\pm$ 13		-36 $\pm$ 13	
FoldX	-32 $\pm$ 4		-35 $\pm$ 5		-45 $\pm$ 6	

с полярным растворителем является движущей силой олигомеризации. Водородные и ионные связи образуются между заряженными остатками спиралей, в число которых входят Glu912, Lys914, Glu916, Lys918, Glu920, Arg927 и Glu932 (рисунок, А). Нужно заметить, что образование таких связей в димерах бывает стерически затруднено ввиду расположения объёмных гидрофобных остатков между заряженными (Рисунок, Д, З).

Непосредственной характеристикой, позволяющей оценить стабильность той или иной олигомерной формы, является энергия взаимодействия в олигомере в расчёте на один мономер. Результаты расчёта этой энергии, выполненные с помощью программ APBS [19] и FoldX [20] (табл. 1), не позволяют отдать предпочтение какой-либо из форм. Представляется достоверной лишь меньшая энергия взаимодействия в димере по сравнению с тетрамером, что согласуется с большей экспонированностью гидрофобных остатков и затрудненным образованием водородных и ионных связей между спиральями в димере.

Аналогичный результат на качественном уровне может быть получен на основе анализа самой аминокислотной последовательности (табл. 2). Меньшая степень олигомеризации в сочетании с меньшей длиной вовлеченной  $\alpha$ -спирали ранее была обнаружена и для аналогичного фрагмента канала Kv7.1 [23].

Ранее предполагалось, что признаком склонности спиралей к тримеризации является наличие мотива R-h-x-x-h-E (где R – остаток аргинина, h – гидрофобный остаток, x – произвольный остаток, E – остаток глутамата), консервативного среди суперспиралей, для которых характерно тримерное

состояние [24] (рисунок, А). В то же время, к настоящему времени известно как минимум две структуры, содержащие мотив R-h-x-x-h-E и закристаллизованные в тетрамерном состоянии – это структуры фрагмента канала Kv7.1 (pdb-код 3bj4 [10]) и Kv7.4 (pdb-код 2ovc [25]).

Таблица 2

Зависимость предсказываемой степени олигомеризации С-концевого спирального фрагмента канала Kv10.2 от порогового значения вероятности суперспирализации (по данным веб-сервиса LOGICOIL)

Значение порога	Вероятная длина спирали, вовлеченной в суперспирализацию, а.о.	Наиболее вероятные состояния	
		Первое	Второе
10%	44	Тетрамер	Параллельный димер
50%	37	Тетрамер	Тример
90%	28	Тример	Антипараллельный димер

Проведенное в данной работе моделирование показывает, что С-концевой спиральный фрагмент канала Kv10.2 (EAG2) может образовывать стабильные димерные, тримерные и тетрамерные суперспирали, причём наибольший вклад в их стабилизацию вносят гидрофобные контакты. Созданная нами модель выявляет детали взаимодействия субъединиц и может быть использована для выявления роли аминокислотных замен, наблюдаемых в ряде патологий. Отметим, что для определения степени олигомеризации цитоплазматических участков каналов семейства EAG необходимо расшифровать структуру полноразмерного канала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (грант №14.616.21.004 от 09.10.15, про-

ект RFMEFI61615X0044) с использованием ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова [26].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saganich M.J., Vega-Saenz de Miera E., Nadal M.S., Baker H., Coetzee W.A., Rudy B. Cloning of components of a novel subthreshold-activating K(+) channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. N 24. P. 10789–10802.
2. Asher V., Sowter H., Shaw R., Bali A., Khan R. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer // *World J. Surg. Oncol.* 2010. Vol. 8. N 1. P. 113.
3. Yang Y., Vasylyev D.V., Dib-Hajj F., Veeramah K.R., Hammer M.F., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. Multistate structural modeling and voltage-clamp analysis of epilepsy/autism mutation Kv10.2-R327H demonstrate the role of this residue in stabilizing the channel closed state // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33. N 42. P. 16586–16593.
4. Wulff H., Pardo L.A., Castle N.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009. Vol. 8. N 12. P. 982–1001.
5. Ju M., Wray D. Molecular identification and characterization of the human eag2 potassium channel // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 524. N 1–3. P. 204–210.
6. Schönherr R., Gessner G., Löber K., Heinemann S.H. Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 514. N 2–3. P. 204–208.
7. Karlova M.G., Pischalnikova A.V., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Sokolova O.S., Shaitan K.V. In vitro fluorescence assay to study the folding of Kv ion channels // *Biophysics.* 2011. Vol. 56. N 2. P. 243–249.
8. Ludwig J., Owen D., Pongs O. Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-à-go-go potassium channel // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 21. P. 6337–6345.
9. Jenke M., Sánchez A., Monje F., Stühmer W., Wessloh R.M., Pardo L.A. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. N 3. P. 395–403.
10. Wiener R., Haitin Y., Shamgar L., Fernández-Alonso M.C., Martos A., Chomsky-Hecht O., Rivas G., Attali B., Hirsch J.A. The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multi-tiered scaffold for subunit assembly and protein interaction // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 9. P. 5815–5830.
11. Ju M., Wray D. Molecular regions responsible for differences in activation between heag channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 342. N 4. P. 1088–1097.
12. Stevens L., Ju M., Wray D. Roles of surface residues of intracellular domains of heag potassium channels // *Eur. Biophys. J.* 2009. Vol. 38. N 4. P. 523–532.
13. Sokolova O.S., Shaitan K.V., Grizel A.V., Popinako A.V., Karlova M.G., Kirpichnikov M.P. Three-dimensional structure of human voltage-gated ion channel kv10.2 studied by electron microscopy of macromolecules and molecular modeling // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2012. Vol. 38. N 2. P. 152–158.
14. Whicher J.R., MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism // *Science.* 2016. Vol. 353. N 6300. P. 664–669.
15. Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Modeling of the binding of peptide blockers to voltage-gated potassium channels: Approaches and evidence // *Acta Naturae.* 2016. Vol. 8. N 2. P. 35–46.
16. Glukhov G.S., Popinako A.V., Grizel A.V., Shaitan K.V., Sokolova O.S. The structure of a human voltage-gated potassium Kv10.2 channel which lacks a cytoplasmic pas domain // *Biophysics.* 2016. Vol. 61. N 4. P. 591–595.
17. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free // *J. Comp. Chem.* 2005. Vol. 26. N 16. P. 1701–1718.
18. Strelkov S.V., Burkhard P. Analysis of  $\alpha$ -helical coiled coils with the program TWISTER reveals a structural mechanism for stutter compensation // *J. Struct. Biol.* 2002. Vol. 137. N 1–2. P. 54–64.
19. Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J., McCammon J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 18. P. 10037–10041.
20. Schymkowitz J., Borg J., Stricher F., Nys R., Rousseau F., Serrano L. The FoldX web server: an online force field // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. Suppl. 2. P. W382–W388.
21. Vincent T.L., Green P.J., Woolfson D.N. LOGICOIL – multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state // *Bioinformatics.* 2013. Vol. 29. N 1. P. 69–76.
22. Rao J.N., Rivera-Santiago R., Li X.E., Lehman W., Dominguez R. Structural analysis of smooth muscle tropomyosin  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 5. P. 3165–3174.
23. Xu Q., Minor D.L. Crystal structure of a trimeric form of the K(V)7.1 (KCNQ1) A-domain tail coiled-coil reveals structural plasticity and context dependent changes in a putative coiled-coil trimerization motif // *Protein Sci.* 2009. Vol. 18. N 10. P. 2100–2114.
24. Kammerer R., Kostrewa D., Progiás P., Honnappa S., Avila D., Lustig A., Winkler F.K., Pieters J., Steinmetz M.O. A conserved trimerization motif controls the topology of short coiled coils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102. N 39. P. 13891–13896.
25. Howard R.J., Clark K.A., Holton J.M., Minor D.L. Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy // *Neuron.* 2007. Vol. 53. N 5. P. 663–675.
26. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V. “Lomonosov”: Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary High Performance Computing: From Petascale toward Exascale* / Ed. J.S. Vetter. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2013. P. 283–307.

Поступила в редакцию  
30.01.2017  
Принята в печать  
02.03.2017

## MOLECULAR BIOLOGY

## MOLECULAR MODELING OF TETRAMERIZATION DOMAIN OF HUMAN POTASSIUM CHANNEL Kv10.2 IN DIFFERENT OLIGOMERIC STATES

V.N. Novoseletsky\*, A.D. Volyntseva, K.V. Shaitan, O.S. Sokolova

Department of Bioengineering, School of Biology,  
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: valeryns@gmail.com

Voltage-gated potassium channel Kv10.2 is expressed in the nervous system, but its functions and involvement in the development of human disease remain poorly understood. Mutant forms of Kv10.2 channel were found in patients with epileptic encephalopathy and autistic features. Molecular modeling of the channel spatial structure is an important tool for gaining knowledge about the molecular aspects of the channel functioning and mechanisms responsible for the pathogenesis. In the present work, we performed molecular modeling of the helical fragment of the human Kv10.2 (hEAG2) C-terminal domain in dimeric, trimeric and tetrameric forms. The stability of all forms was confirmed by molecular dynamics simulation. Contacts and interactions, stabilizing the structure, were identified.

**Keywords:** *voltage-gated potassium channel Kv10.2, oligomerization, leucine zipper, coiled coil, molecular modeling, molecular dynamics.*

**Сведения об авторах**

*Новоселецкий Валерий Николаевич* – канд. физ-мат. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: valeryns@gmail.com

*Волынцева Алёна Дмитриевна* – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: alenkavolynceva@gmail.com

*Шайтан Константин Вольдемарович* – докт. физ-мат. наук, проф., зам. зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan49@yandex.ru

*Соколова Ольга Сергеевна* - докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova184@gmail.com

## ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 577.19:581.1

## ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА АЗОТА НА ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИМЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ СТенок КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

Н.Р. Мейчик, Ю.И. Николаева, М.А. Кушунина\*

Кафедра физиологии растений, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: mkushunina@gmail.com

Исследованы ионообменные свойства полимеров клеточных стенок, выделенных из корней растений пшеницы *Triticum aestivum* L., выращенных в водной культуре на питательной среде, содержащей (+N-вариант) или не содержащей (N-дефицитный вариант) нитрат. Независимо от режима азотного питания клеточные стенки корня содержали четыре типа ионообменных групп: первичные аминогруппы с  $pK_a < 3$  в составе структурных белков, карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты ( $pK_a \sim 4,7$ ) в составе пектинов, карбоксильные группы гидроксикоричных кислот ( $pK_a \sim 7,3$ ) и фенольные ОН-группы в составе лигнина ( $pK_a \sim 10,2$ ). Количественное соотношение типов ионообменных групп, массовая доля клеточной стенки в сухой массе корня и коэффициент её набухания в водных растворах зависели от наличия нитрата в среде выращивания: в клеточных стенках N-дефицитного варианта по сравнению с +N-вариантом были выше содержание фенольных ОН-групп (в 2,4 раза) и массовая доля стенки (в 1,24 раза), а коэффициент набухания, напротив, был ниже на 10%. Полученные данные свидетельствуют о том, что при дефиците азота в корнях формируется более мощная клеточная стенка с более высокой степенью сшивки полимеров – вероятно, за счёт повышенного содержания в ней лигнина.

**Ключевые слова:** клеточная стенка, азот, пшеница, карбоксильные группы, минеральное питание, ионный обмен.

Уровень снабжения растений азотом является одним из основных факторов, определяющих их рост и продуктивность. Растения получают азот из почвы главным образом в форме неорганических ионов – нитрата  $\text{NO}_3^-$  и аммония  $\text{NH}_4^+$ . Форма, в которой азот присутствует в среде, влияет на такие интегральные физиологические параметры растения, как, например, фотосинтетическая продуктивность [1], поглощение и транспорт других макро- и микроэлементов [2], рост главного и боковых корней [3].

Вместе с тем, тонкие механизмы процесса адаптации растений к различному содержанию и химической форме почвенного азота во многом не известны, в частности, те, что связаны с функционированием клеточной стенки (КС). Известно, что ионообменные свойства полимеров КС клеток корня играют важную роль на первичных этапах поглощения элементов минерального питания из почвы [4]. В составе КС растений обнаружено четыре типа ионообменных групп [5]: 1) карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты (ПГК;  $pK_a$  4–5) в составе пектинов, 2) карбоксильные группы гидроксикоричных кислот (ГКК;  $pK_a$  6–7), 3) фенольные ОН-группы ( $pK_a \sim 10$ ) в составе лигнина, 4) первичные аминогруппы ( $pK_a < 3$ ), принадлежащие структурным белкам КС. При

физиологических значениях pH (4–8) в ионообменных реакциях способны участвовать только карбоксильные группы, так как константа ионизации двух других групп лежит за пределами указанной области. Суммарное количество ионообменных групп в КС растений колеблется в широких пределах и составляет 700–1500 мкмоль на г сухой массы КС [6]. При этом самое высокое содержание карбоксильных групп ПГК обнаружено в КС корней бобовых растений (500–700 мкмоль на г сухой массы КС), а карбоксильных групп ГКК – у злаков и маревых (400–500 мкмоль на г сухой массы КС) [6]. Эти показатели коррелируют с содержанием соответствующих полимеров в КС. У двудольных и однодольных (за исключением злаков) пектины составляют 20–50% КС, тогда как у злаков – не более 10% [7]. ГКК (главным образом, феруловая кислота), наряду с ПГК, принимают участие в ионообменных реакциях [6] и играют важную роль в образовании сшивок между полимерными цепями в КС злаков и маревых [7].

Известно, что химический состав КС зависит от условий произрастания растений, в частности от характера минерального питания [7–10]. Однако работы, посвященные влиянию азотного питания на характеристики КС корней растений,

крайне немногочисленны и касаются, в основном, анализа транскриптома генов, ответственных за синтез и модификацию КС, а не детального описания её химического состава [9]. В большинстве случаев выделяют два основных механизма изменения состава КС в ответ на абиотические стрессы, в том числе на дефицит азота [10]: 1) повышение содержания ферментов (ксилоглюканэндотрансглюколаз и экспансинов), разрыхляющих первичную КС; 2) увеличение степени разветвленности рамногалактуронана I, что увеличивает пластичность КС; 3) утолщение вторичной КС посредством отложения в ней гемицеллюлоз и лигнина. При использовании  $\text{NH}_4^+$  как единственного источника азота в КС корней риса наблюдалось снижение содержания пектиновых веществ и гемицеллюлоз, что сопровождалось уменьшением катионообменной способности полимеров КС [8].

Таким образом, анализ данных литературы показывает, что информация о влиянии различных типов азотного питания на состав и свойства полимерного матрикса КС крайне ограничена. Цель настоящего исследования заключалась в сравнении ионообменных свойств полимеров КС корней растений пшеницы, выращенных в водной культуре на питательной среде, содержащей или не содержащей нитрат.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили 19-дневные растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт “Инна”). Растения выращивали в водной культуре при постоянной аэрации на модифицированной среде Прянишникова: 1) +N-вариант:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (3 мМ),  $\text{CaHPO}_4$  (1 мМ),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 мМ),  $\text{KCl}$  (2 мМ),  $\text{FeCl}_3$  (0,15 мМ); 2) N-дефицитный вариант:  $\text{CaSO}_4$  (2 мМ),  $\text{CaHPO}_4$  (1 мМ),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 мМ),  $\text{KCl}$  (2 мМ),  $\text{FeCl}_3$  (0,15 мМ). Смену растворов проводили каждые 4 сут. Растения содержали в климатической камере при температуре 24–26°C и световом режиме 14 ч день (освещённость 110 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>·с) и 10 ч ночь.

КС корней выделяли в соответствии с ранее описанной методикой [5]. Отсеченные и промытые дистиллированной водой корни (~5 г) промывали последовательно 1%-ным раствором  $\text{NaOH}$  (~0,5 л, в течение суток, при постоянном перемешивании), дистиллированной водой (~2 л, в течение 2–3 ч), 1%-ным раствором  $\text{HCl}$  (~0,5 л, в течение суток, при постоянном перемешивании) и затем дистиллированной водой до исчезновения в промывных водах хлорид-иона (определяли титрованием с  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ). Препараты КС затем высушивали до постоянного веса при 55–60°C. Указанный метод стандартизации, то есть метод переведения всех имеющихся в структуре КС катионообменных групп в  $\text{H}^+$ -форму, а анионообменных (аминогрупп) – в форму свободного амина ( $-\text{NH}_2$ ),

позволяет проводить сравнительное исследование сорбционных свойств образцов с различным содержанием функциональных групп [11]. Ранее нами было показано, что использование данной методики позволяет получить образцы КС, свободные от ДНК и цитоплазматических белков и сходные по содержанию ПГК и структурных белков с КС, изолированными с помощью других методов [12].

Потенциометрическое титрование осуществляли методом отдельных навесок [6]. Навески сухой измельченной КС ( $0,0400 \pm 0,0001$  г) помещали в бюксы с притертой пробкой и заливали 12,5 мл растворов  $\text{KOH}$  или  $\text{HCl}$  различной концентрации, но с постоянной ионной силой (100 мМ), которую создавали соответствующими растворами  $\text{NaCl}$ . Диапазон изменения концентраций кислоты и щелочи составлял 0–10 мМ. По истечении 48 ч КС отделяли от раствора, в котором определяли рН и концентрацию оставшейся кислоты или щелочи титрованием с индикатором бромтимоловым синим. По разнице концентраций  $\text{H}^+$  или  $\text{OH}^-$  рассчитывали сорбционную способность КС при соответствующем значении  $\text{pH}_i$  по формуле:

$$S_i^{\text{кат,ан}} = \frac{|(C_0 - C_i)| \times V}{g}, \quad (1)$$

где  $S_i^{\text{кат,ан}}$  – катионообменная или анионообменная способность КС при  $\text{pH}_i$  (2,8–12), мкмоль на г сухой массы КС;  $C_0$  и  $C_i$  – исходная и равновесная (после контакта с КС) концентрации  $\text{NaOH}$  или  $\text{HCl}$  в растворе, мМ;  $V$  – объём раствора, мл;  $g$  – сухая масса образца КС, г.

Число типов ионообменных групп в КС ( $j$ ), а также их содержание ( $\Delta S^j$ ) определяли по дифференциальным кривым ( $dS^j/d\text{pH}_i = f(\text{pH}_i)$ ), как описано ранее [6]. Степень ионизации ( $\alpha$ ) для каждой группы рассчитывали по формуле:

$$\alpha = S^j/\Delta S^j, \quad (2)$$

где  $S^j$  – содержание диссоциированных групп  $j$ -го типа при соответствующем значении рН.

Чтобы рассчитать константу ионизации для каждой ионообменной группы, использовали модифицированное Грегором уравнение Хендерсона–Хассельбаха [13]:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + n \lg (\alpha/(1 - \alpha)), \quad (3)$$

где  $\text{p}K_a$  – кажущаяся константа ионизации ионообменной группы полимера;  $\alpha$  – степень её ионизации;  $n$  – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона [14].

Используя установленные значения параметров ( $\Delta S^j$ ,  $\text{p}K_a^j$ ,  $n^j$ ), рассчитывали  $S_i^{\text{pac}}$  по суммарному уравнению [6]:

$$S_i^{\text{pac}} = S_o^{\text{кат}} - \sum_{j,i=1}^{k,m} \frac{\Delta S^j}{1 + 10^{\frac{\text{p}K_a^j - \text{pH}_i}{n^j}}}, \quad (4)$$

где  $S_i^{\text{pac}}$  – расчётное значение ионообменной способности КС при соответствующем значении  $\text{pH}_i$ ;

$S_o^{кам}$  – максимальная катионообменная способность КС;  $\Delta S_j^i$  – содержание ионообменных групп  $j$ -го типа;  $pK_a^j$  – кажущаяся константа ионизации ионообменных групп  $j$ -го типа;  $n^j$  – константа уравнения (3) для ионообменных групп  $j$ -го типа;  $k$  – число точек на потенциометрической кривой,  $m$  – число типов ионообменных групп.  $S_o^{кам}$ ,  $\Delta S_j^i$  и  $S_i^{расч}$  выражены в мкмоль на г сухой массы КС.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_i^{расч} = B \times S_i^{эсп} + A, \quad (5)$$

где  $S_i^{расч}$  и  $S_i^{эсп}$  – рассчитанная по уравнению (4) и экспериментальная (уравнение (1)) ионообменная способность КС при соответствующем значении рН, мкмоль на г сухой массы КС;  $A$  и  $B$  – параметры регрессии.

Весовой коэффициент набухания КС ( $K_{КС}$ , г  $H_2O$  на г сухой массы КС) в растворах с рН 2,8–12 и ионной силой 100 мМ определяли в соответствии с методикой, описанной в работе [6] по формуле:

$$K_{КС} = (G_F - G_D) / G_D, \quad (6)$$

где  $G_F$  и  $G_D$  – сырая и сухая массы образцов КС, г.

Долю сухой массы КС ( $G_{КС}$ ) в сухой массе корней (%) определяли по формуле:

$$G_{КС} = (G_{КС} / G_k) \times 100, \quad (7)$$

где  $G_k$  и  $G_{КС}$ , соответственно, – сухая масса корней и выделенных из них КС, г.

Эксперименты повторяли три раза, аналитические измерения – 6–10 раз. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics. Приведены средние значения и стандартные ошибки среднего. Достоверность различий между изучаемыми показателями определяли с помощью двухвыборочного  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Нормальность распределений проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова.

## Результаты и обсуждение

Экспериментальные кривые потенциометрического титрования  $S_i = f(\text{pH}_i)$  для КС корней пшеницы имеют несколько точек перегиба, что свидетельствует о наличии в полимерном матриксе КС нескольких типов ионообменных групп. При  $\text{pH} > 10,8$  и  $\text{pH} < 3$  значения сорбционной способности КС по NaOH ( $S_o^{ан}$ ) и HCl ( $S_o^{кам}$ ) достигают максимального уровня и характеризуют общее содержание как кислотных, так и основных групп, которые имеются в структуре КС и потенциально способны принимать участие в реакциях обмена при соответствующих значениях рН среды в апопласте. И в +N-, и в N-дефицитном варианте значения  $S_o^{кам}$  существенно превышают значения  $S_o^{ан}$

(рис. 1), т.е. независимо от типа азотного питания КС корней пшеницы обладают в основном катионообменными свойствами. КС обоих вариантов содержат небольшое и приблизительно равное количество анионообменных групп (рис. 1,  $S_o^{ан}$ ), но значительно различаются по содержанию катионообменных групп (рис. 1,  $S_o^{кам}$ ).

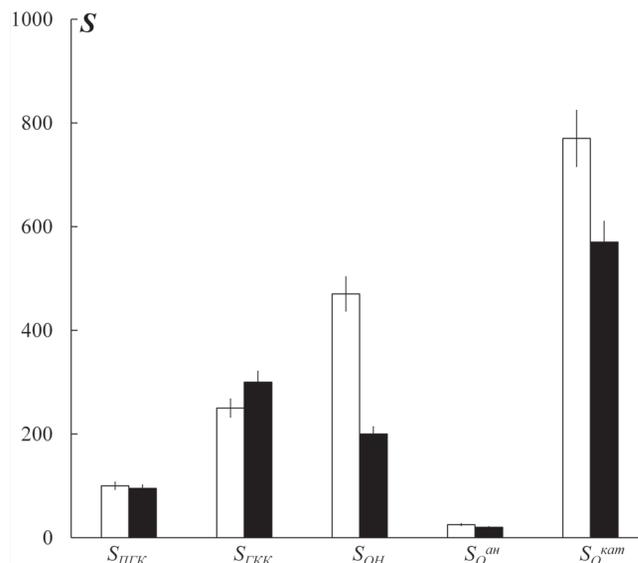


Рис. 1. Содержание (мкмоль на г сухой массы клеточных стенок) карбоксильных групп полигалактуроновой кислоты ( $S_{ПГК}$ ), карбоксильных групп гидроксикоричных кислот ( $S_{ГКК}$ ), фенольных ОН-групп ( $S_{ОН}$ ), а также суммарное содержание анионообменных ( $S_o^{ан}$ ) и катионообменных ( $S_o^{кам}$ ) групп в клеточных стенках, выделенных из корней растений пшеницы, выращенных при разных режимах азотного питания: белые прямоугольники – N-дефицитный вариант; чёрные прямоугольники – +N-вариант

Разделение экспериментальных кривых на монотонные нелинейные участки проводили согласно дифференциальным кривым  $dS/d\text{pH} = f(\text{pH})$ , имеющим ряд минимумов, которые соответствуют началу ( $\alpha = 0$ ) и концу ( $\alpha = 1$ ) ионизации функциональной группы  $j$ -го типа. Оценка примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия методом регрессионного анализа показывает, что расчётные и экспериментальные значения ионообменной способности КС совпадают в пределах погрешностей измерений, о чём свидетельствуют значения параметров регрессии ( $A$ ,  $B$ ) и коэффициент корреляции ( $r$ ) для зависимости  $S_i^{расч} = f(S_i^{эсп})$  (уравнение (5)): для +N-варианта  $B = 0,95$ ,  $A = 12,5$ ,  $r = 0,984$ , для N-дефицитного варианта –  $B = 0,97$ ,  $A = 15,9$ ,  $r = 0,982$ . Было установлено, что в КС обоих вариантов присутствуют три типа катионообменных групп и один тип анионообменных. Для анионообменных групп (аминогруппы в составе структурных белков КС [5]) расчёт константы ионизации не проводили, так как их содержание (20–25 мкмоль на г сухой массы КС) слишком мало. КС корней в обоих вариантах выращивания не различаются по качественному составу катионообмен-

ных групп, о чем свидетельствует близость значений  $pK_a$  соответствующих групп (таблица). В соответствии с ранее полученными результатами [6] катионообменные группы с  $pK_a \sim 4,7$  являются карбоксильными группами ПГК в составе пектинов, с  $pK_a \sim 7,3$  — карбоксильными группами ГКК, а с  $pK_a \sim 10,2$  — фенольными ОН-группами в составе лигнина.

Таблица

Параметры уравнения (3) для клеточных стенок корней растений пшеницы, выращенных при разных режимах азотного питания.

$j$  — тип группы (1 — карбоксильные группы полигалактуроновой кислоты; 2 — карбоксильные группы гидроксикоричных кислот; 3 — фенольные ОН-группы);  $pK_a^j$  — константа ионизации группы  $j$ -го типа;  $n^j$  — константа уравнения (3) для группы  $j$ -го типа;  $r^j$  — коэффициент корреляции для группы  $j$ -го типа;  $k$  — количество точек на прямой

Вариант выращивания	$j$	$pK_a^j$	$n^j$	$r^j$	$k$
+N	1	4,72±0,06	0,75±0,08	0,965	8
	2	7,31±0,04	1,47±0,09	0,993	6
	3	10,06±0,16	2,04±0,41	0,926	6
N-дефицитный	1	4,65±0,05	1,08±0,10	0,980	7
	2	7,35±0,04	1,15±0,06	0,992	8
	3	10,36±0,06	1,48±0,14	0,978	7

КС обоих вариантов достоверно не различаются по содержанию карбоксильных групп ПГК и ГКК (рис. 1,  $S_{ПГК}$  и  $S_{ГКК}$ ). Различие состоит только в содержании фенольных ОН-групп (рис. 1,  $S_{ОН}$ ): при дефиците азота их количество в 2,4 раза больше. Можно предположить, что количество пектинов и ГКК в КС одинаково в обоих вариантах выращивания, тогда как содержание лигнина в КС резко возрастает при дефиците азота. Повышенное содержание фенольных соединений в тканях корня было также показано для N-дефицитных растений ромашки (*Matricaria chamomilla*) [3]. Интенсивная лигнификация вторичной КС наблюдается при воздействии и других неблагоприятных факторов внешней среды, таких как засуха, пониженные температуры и засоление [10].

Доля КС в сухой массе корней значительно зависит от наличия нитрата в среде выращивания. Значение этого показателя в N-дефицитном варианте составляет 57±2,1%, в +N-варианте — 46±3,5%. Можно предположить, что увеличение массы КС происходит за счёт накопления в ней лигнина. Кроме того, известно, что при дефиците азота снижаются затраты углеводов на восстановление нитрата и ассимиляцию аммония в корнях [15], поэтому может активизироваться синтез целлюлозы и сшивочных гликанов, не имеющих в своем составе ионообменных групп.

Известно, что коэффициент набухания синтетического ионообменного материала является функцией степени поперечной связанности (сшивки) его полимерных цепей, общего числа ионообменных групп, степени их диссоциации, концентрации внешнего раствора и зависит от радиуса гидратированного иона, которым заполняется сорбент. Среди названных главный фактор, который определяет набухание — это степень поперечной сшивки полимерных цепей [14]. Можно полагать, что экспериментальная оценка набухания КС как природного ионообменника даст возможность оценить жесткость её трехмерной структуры и способность изменять объём под воздействием различных внешних факторов. Измерение коэффициента набухания КС ( $K_{КС}$ ) показало, что во всем исследуемом диапазоне рН в N-дефицитном варианте этот показатель ниже, чем в +N-варианте, на 10–30% в зависимости от рН раствора, при этом с увеличением рН возрастает и значение  $K_{КС}$  (рис. 2). Этот результат свидетельствует о том, что при недостатке азота возрастает степень сшивки полимеров КС — вероятно, за счёт её интенсивной лигнификации.

Таким образом, можно полагать, что в ответ на стресс, обусловленный дефицитом азота в среде, происходит активация синтеза лигнина во вторичной КС корней, что приводит к увеличению массовой доли КС, а также к снижению способности КС к набуханию.

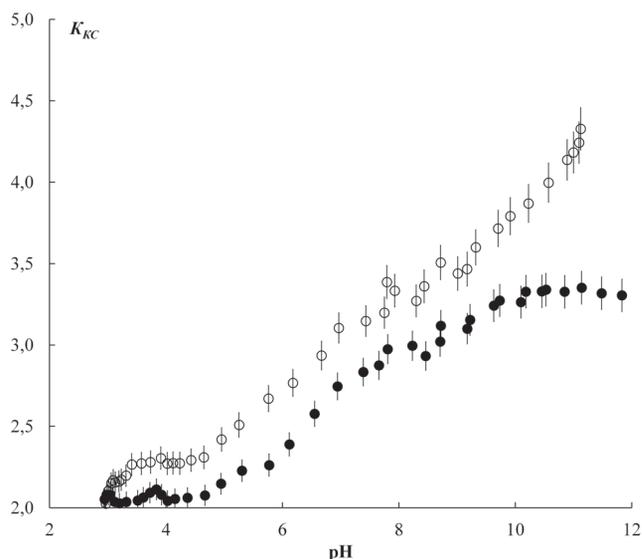


Рис. 2. Зависимость коэффициента набухания клеточных стенок ( $K_{КС}$ , г  $H_2O$  на г сухой массы КС) корней пшеницы от рН и режима азотного питания: чёрные точки — +N-вариант; белые точки — N-дефицитный вариант

Анализ состава и свойств изолированных КС выполнен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-00201); культивирование растений выполнено в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, тема АААА-А16-116021660106-0).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cramer M.D., Lewis O.A.M.* The influence of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  nutrition on the carbon and nitrogen partitioning characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants // *Plant Soil*. 1993. Vol. 154. N. 2. P. 289–300.
2. *Wilcox G.E., Hoff J.E., Jones C.M.* Ammonium reduction of calcium and magnesium content of tomato and sweetcorn and influence on incidence of blossom end rot of tomato fruit // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1973. Vol. 98. N. 1. P. 86–89.
3. *Kováčik J., Bačkor M.* Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants // *Plant Soil*. 2007. Vol. 297. N. 1. P. 255–265.
4. *Sattelmacher B.* The apoplast and its significance for plant mineral nutrition // *New Phytol.* 2001. Vol. 149. N. 2. P. 167–192.
5. *Meychik N.R., Yermakov I.P.* A new approach to the investigation on the ionogenic groups of root cell walls // *Plant Soil*. 1999. Vol. 217. N. 1. P. 257–264.
6. *Meychik N.R., Yermakov I.P.* Ion-exchange properties of plant root cell walls // *Plant Soil*. 2001. Vol. 234. N. 2. P. 181–193.
7. *O'Neill M.A., York W.S.* The composition and structure of plant primary cell walls // *The plant cell wall* / Ed. J.K.C. Rose. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 1–54.
8. *Wang W., Zhao X.Q., Chen R.F., Dong X.Y., Lan P., Ma J.F., Shen R.F.* Altered cell wall properties are responsible for ammonium-reduced aluminum accumulation in rice roots // *Plant Cell Environ.* 2015. Vol. 38. N. 7. P. 1382–1390.
9. *Scheible W.-R., Morcuende R., Czechowski T., Fritz C., Osuna D., Palacios-Rojas N., Schindelasch D., Thimm O., Uvardi M.K., Stitt M.* Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 136. N. 1. P. 2483–2499.
10. *Le Gall H., Philippe F., Domon J.M., Gillet F., Peloux J., Rayon C.* Cell wall metabolism in response to abiotic stress // *Plants*. 2015. Vol. 4. N. 1. P. 112–166.
11. *Лейкин Ю.А., Мейчик Н.Р., Соловьев В.К.* Кислотно-основное равновесие полиамфолитов с пиридиновыми и фосфоновокислотными группами // *Ж. физ. химии*. 1978. Т. 52. № 7. С. 1420–1424.
12. *Meychik N., Nikolaeva Y., Kushunina M., Yermakov I.* Are the carboxyl groups of pectin polymers the only metal-binding sites in plant cell walls? // *Plant Soil*. 2014. Vol. 381. N. 1. P. 25–34.
13. *Gregor H.P., Luttinger L.D., Loeb E.M.* Titration of polyacrylic acid with quaternary ammonium bases // *J. Amer. Chem. Soc.* 1954. Vol. 76. N. 22. P. 5879–5880.
14. *Шатаева Л.А., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Е.* Карбоксильные иониты в биологии. Л.: Наука, 1979. 286 с.
15. *van der Werf A., Nagel O.W.* Carbon allocation to shoots and roots in relation to nitrogen supply is mediated by cytokinins and sucrose: Opinion // *Plant Soil*. 1996. Vol. 185. N. 1. P. 21–32.
16. *Гельферих Ф.* Иониты. М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. 492 с.

Поступила в редакцию  
11.12.2016  
Принята к печати  
02.03.2017

## PLANT PHYSIOLOGY

## EFFECT OF NITROGEN DEFICIENCY ON ION-EXCHANGE PROPERTIES OF WHEAT ROOT CELL WALL POLYMERS

*N.R. Meychik, Yu.I. Nikolaeva, M.A. Kushunina\**

*Department of Plant Physiology, School of Biology,  
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia  
\*e-mail: mkushunina@gmail.com*

Ion-exchange properties of root cell walls of *Triticum aestivum* L. plants grown in hydroponic nutrient medium with nitrate or without nitrogen source were investigated. The root cell walls contained four types of ion-exchange groups irrespective of the nitrogen nutrition: primary amino groups ( $\text{pK}_a < 3$ ) of structural cell wall proteins, carboxyl groups of polygalacturonic acid ( $\text{pK}_a \sim 4.7$ ) of pectin, carboxyl groups of hydroxycinnamic acids ( $\text{pK}_a \sim 7.3$ ), and phenolic OH-groups of lignin ( $\text{pK}_a \sim 10.2$ ). Content of ion-exchange groups, the cell wall dry weight to root dry weight ratio, and the swelling coefficient of the cell walls were influenced by the presence of nitrate in the medium. The root cell walls of N-deficient plants had 2.4 times higher content of phenolic OH-groups, 1.24 times higher cell wall dry weight to root dry weight ratio, and 10% lower cell wall swelling coefficient, than nitrate-supplied plants. The obtained results indicate that nitrogen deficiency causes an increase in cell wall thickness, which probably is a result of increased lignin content.

**Key words:** *cell wall, nitrogen, wheat, carboxyl groups, mineral nutrition, ion exchange.*

**Сведения об авторах**

*Мейчик Наталия Робертовна* — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-49; e-mail: meychik@mail.ru

*Николаева Юлия Игоревна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-49; e-mail: yuliya\_nikolaeva@mail.ru

*Кушунина Мария Александровна* — науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-44-49; e-mail: mkushunina@gmail.com

## ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.115.3:612.115.064

## КОРРЕКЦИЯ ПРОЯВЛЕНИЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА У КРЫС С ПОМОЩЬЮ НЕКОТОРЫХ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ

Л.А. Ляпина<sup>1,\*</sup>, М.Е. Григорьева<sup>1</sup>, Т.Ю. Оберган<sup>1</sup>, Н.Ф. Мясоедов<sup>2</sup>, Л.А. Андреева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова, кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Институт молекулярной генетики РАН, Россия, 123182, г. Москва, площадь акад. Курчатова, д. 2

\*e-mail: lyapinal@mail.ru

Функциональная характеристика новых коротких пептидов глипролинового ряда, способных оказывать регуляторное влияние на функциональное состояние системы гемостаза, а также жировой и углеводный обмен в организме, является актуальной задачей физиологии и медицины. В настоящей работе используется модель экспериментального метаболического синдрома, созданная путем постоянного кормления животных высококалорийной пищей. Это приводит к повышению свертываемости, увеличению концентрации глюкозы, холестерина липопротеидов низкой плотности, триглицеридов, а также уровня общего холестерина в крови, что сопровождается прибавкой массы тела крыс. Спустя 6 нед. после развития метаболического синдрома крысам вводили интраназально семикратно через каждые 24 ч аргининсодержащие пептиды (Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro, Arg-Glu-Arg-Val-Gly-Pro, Arg-Glu-Arg-Gly-Pro). Они оказывали уникальное сочетанное действие на организм, восстанавливая до нормальных величин параметры жирового обмена, системы гемостаза и концентрации глюкозы в крови. Корректирующий эффект исследуемых пептидов выявлялся через 20 ч после последнего введения и сохранялся на протяжении 168 ч даже при дальнейшем содержании крыс на высококалорийном рационе. Исследованные нами пептиды глипролинового ряда относятся к терапевтическим нормогликемическим и гиполипидемическим средствам. Они блокируют накопление новых жировых отложений в организме, а также обладают противосвертывающим и антитромботическим действием при нарушениях жирового обмена веществ. Наиболее выраженным и устойчивым позитивным действием на организм обладал пептид Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro.

**Ключевые слова:** аргининсодержащие пептиды, метаболический синдром, система гемостаза, липидный профиль, глюкоза крови

Регуляторные пептиды глипролинового ряда (Pro-Gly-Pro, Pro-Gly, Gly-Pro и другие) обеспечивают нормальное функционирование свертывающей, противосвертывающей и других систем организма [1–3]. Известны короткие пептиды другой химической структуры, которые проявляют антитромбоцитарную активность за счёт ингибирования процесса связывания фибриногена с тромбоцитами. Так, пептид со структурой His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, соответствующей участку гамма-цепи молекулы фибриногена человека (последовательность 400–411) в области специфического узнавания рецептора тромбоцита, способен подавлять агрегацию тромбоцитов [4]. Повышение свертываемости крови, нарушения липидного профиля и углеводного обмена в организме приводят к развитию метаболического синдрома (МС) [5]. Последствиями его являются атеросклеротические изменения в сосудах, сопровождающиеся возникновением атеросклеротической бляшки

на внутренней поверхности сосудистой стенки [6]. При развитии МС в эндотелии происходит постепенное снижение интенсивности синтеза эндогенных вазодилататорных веществ. Для восстановления метаболизма в органах и тканях применяют биостимуляторы гиполипидемического действия [7], а для коррекции нарушенных функций свертывающей и противосвертывающей систем крови проводят антитромботическую терапию [8]. Для лечения МС и регулирования углеводного и холестеринного гомеостаза используют статины [9, 10], а также вещества пептидной природы – Lys-Gln-W [11], панкреатин [12] и др. Кроме того, с этой целью проводят комбинированную терапию, например, с использованием препарата Нолипрел® А форте, содержащего аргининовую соль периндоприла [13]. Аргинин противодействует тромбообразованию, снижает уровень холестерина в крови и предупреждает развитие атеросклероза. Показано, что у людей с гиперхолестеринемией, атеросклерозом и различ-

ными сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая ишемический инсульт, а также у животных, у которых моделировались эти состояния, длительное пероральное применение аргинина существенно улучшает функцию эндотелия и клиническую симптоматику [14, 15].

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном исследовании на модели животных с экспериментальным МС корригирующего действия аргининсодержащих регуляторных пептидов Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERPGP), Arg-Glu-Arg-Val-Gly-Pro (RERVGP) и Arg-Glu-Arg-Gly-Pro (RERGP) на липидный обмен, состояние системы гемостаза, концентрацию сахара крови и массу тела животных.

### Материалы и методы

В работе применяли пептиды RERPGP, RERVGP и RERGP, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН (Москва).

В экспериментах было использовано 55 лабораторных белых крыс—самцов линии Wistar с массой тела 300–320 г. Все исследования на животных проведены в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006). Метаболические нарушения у крыс вызывали высококалорийной диетой (ВКД), которая была выбрана на основании предыдущих исследований [16]. Энергетическая ценность ВКД составляла 135% от стандартного рациона и включала избыток углеводов, холестерина и насыщенных жирных кислот — жира свиного (15%), манной каши на молоке (30%), муки пшеничной и хлеба (15%), сахарного песка (5%), животных жиров (маргарин с гидрогенизированными жирами, майонез, сыр) (25%), стандартного гранулированного корма “Лабораторкорм”, Россия (10%). В качестве питья животные получали 10%-ный раствор глюкозы. Крыс содержали на ВКД на протяжении всего периода эксперимента. Через 6 нед. от его начала крысы были разделены на четыре группы, в каждой по 12 животных: группе 1 вводили RERPGP, группе 2 — RERVGP, группе 3 — RERGP, группе 4 (контрольной) — физиологический раствор NaCl. Первым трём группам пептиды вводили ежедневно

через каждые 24 ч в течение 7 сут интраназально в дозе 50 мкг/кг. Дополнительно в экспериментах использовали нормальных здоровых крыс (7 животных), не получавших никаких препаратов и содержавшихся на обычном лабораторном рационе. Первый отбор крови на анализы производили через 20 ч после последнего (7-го) введения пептидов или физиологического раствора, а второй отбор — через 168 ч (рис. 1).

Взятие крови у животных осуществляли из яремной вены (*venae jugularis*) в количестве 2 мл с использованием в качестве консерванта 3,8%-ного раствора цитрата натрия в соотношении кровь/консервант = 9/1. Образцы крови центрифугировали в двух режимах: при 1000g в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы (для определения агрегации тромбоцитов) и при 3000g в течение 10–12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы (для измерения остальных параметров).

Показатели жирового обмена в плазме крови исследовали энзиматическим колориметрическим методом с использованием наборов реагентов фирмы “Ольвекс Диагностикум” (Россия). При этом определяли (в ммоль/л) концентрацию общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП) и триглицеридов (ТГ).

Концентрацию глюкозы в крови определяли на биохимическом анализаторе One Touch Horizon (США) с использованием специальных тест-полосок для данного прибора. В плазме крови измеряли следующие биохимические параметры гемостаза: суммарную (СФА), неферментативную (НФА) и ферментативную (ФФА) фибринолитическую активность, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), агрегацию тромбоцитов (АТ) [17].

Животных взвешивали 4 раза: 1-й раз — до начала проведения эксперимента, 2-й раз — через 6 нед. после начала содержания крыс на ВКД, т.е. при развитии у них МС, 3-й раз — через 20 ч после многократного введения пептидов или физиологического раствора и 4-й раз — через 168 ч после последнего введения препаратов.

Все данные обработаны статистически с использованием непараметрического критерия Вилкоксона (программа STATISTICA 6.0).



Рис. 1. Схема проведения эксперимента

## Результаты и обсуждение

**Моделирование МС у крыс.** Содержание крыс в течение 6 нед. на ВКД, обогащённой жирами и углеводами, приводило к развитию нарушений липидного обмена: в плазме крови животных наблюдалось достоверное повышение концентрации ОХ (на 23%), ТГ (на 214%) и Хс-ЛПНП (на 94%) по сравнению с теми же показателями у нормальных здоровых крыс. Также ВКД способствовала развитию у крыс ожирения, поскольку прирост массы тела за 6 нед. составил в среднем 192% от значений прироста у нормальных здоровых крыс. По параметрам гемостаза у животных, находившихся на ВКД, отмечалась гиперкоагуляция: достоверно повысилась свёртываемость крови (на 18% снизился показатель АЧТВ), уменьшился фибринолиз по тестам СФА – на 37%, НФА – на 60% и ФФА – на 32%, АТ возросла на 71% по сравнению с нормой. При этом отмечено достоверное повышение уровня глюкозы крови в 2 раза по сравнению с нормой. Полученные данные свидетельствуют о развитии

МС в организме крыс, с которыми в дальнейшем проводились эксперименты.

**Действие пептидов на показатели системы гемостаза.** Спустя 20 ч после последнего интраназального введения каждого из исследованных пептидов крысам с развившимся МС в плазме крови повышался фибринолиз, а именно, СФА – на 63% (RERP GP), 58% (RERV GP), 30% (RERG P); НФА – на 170% (RERP GP, RERV GP), 151% (RERG P) и ФФА – на 23% (RERP GP), 31% (RERV GP), 16% (RERG P); увеличивались антикоагулянтная активность – на 27% (RERP GP), 15% (RERV GP), 27% (RERG P) и антитромбоцитарная активность – на 41,2% (RERP GP), 38,4% (RERV GP), 49,6% (RERG P); уровень глюкозы крови снизился на 18% (RERP GP), 37% (RERV GP) и на 34% (RERG P) по сравнению с контролем, принятым за 100% (таблица).

Итак, через 20 ч после окончания 7-кратного введения пептидов антикоагулянтный, антитромбоцитарный, неферментативный и ферментативный фибринолитические эффекты в плазме крови отмечены при применении каждого из трёх иссле-

Таблица

Фибринолитическая (СФА – суммарная, НФА – неферментативная, ФФА – ферментативная) активность, уровень глюкозы, антикоагулянтная активность (по тесту АЧТВ) и агрегация тромбоцитов (АТ) в крови крыс, содержащихся на ВКД, в разные сроки после интраназального 7-кратного применения пептидов ( $M \pm m$ )

Группы животных	СФА, мм <sup>2</sup>	НФА, мм <sup>2</sup>	ФФА, мм <sup>2</sup>	Уровень глюкозы, ммоль/л	АТ, %	АЧТВ, с
Через 20 ч после последнего введения пептидов						
Контроль (ВКД)	21,0 ± 0,9	8,2 ± 0,4	12,8 ± 0,9	6,8 ± 0,3	100 ± 2,8	28,9 ± 1,8
RERP GP	39,2 ± 1,3 **	22,2 ± 0,8 **	16,4 ± 0,5 *	5,6 ± 0,3 **	58,8 ± 3,8 **	36,8 ± 1,4 **
RERV GP	44,0 ± 3,1 **	30,2 ± 1,1 **	13,8 ± 1,2	4,3 ± 0,3 **	61,6 ± 1,0 **	33,3 ± 1,2 *
RERG P	33,2 ± 0,7 **	20,8 ± 0,9 **	12,3 ± 1,2	4,5 ± 0,2 *	50,4 ± 2,8 **	36,9 ± 1,5 **
Норма (здоровые крысы)	38,0 ± 1,1 **	20,3 ± 0,5 **	17,7 ± 0,6 *	4,0 ± 0,2 **	61 ± 9,3 **	34,2 ± 0,9 *
Через 168 ч после последнего введения пептидов						
Контроль (ВКД)	24,0 ± 1,0	12,7 ± 1,4	8,9 ± 0,7	6,9 ± 0,3	100 ± 3,1	36,0 ± 1,8
RERP GP	38,4 ± 1,3 **	23,6 ± 0,8 **	14,0 ± 0,5 **	5,3 ± 0,1 **	36,7 ± 2,9 **	41,3 ± 1,9 *
RERV GP	35,6 ± 1,1 **	22,2 ± 1,0 **	13,0 ± 1,3 **	4,9 ± 0,2 **	43,5 ± 5,2 **	43,5 ± 1,8 **
RERG P	32,0 ± 0,9 **	20,8 ± 1,1 **	11,2 ± 0,9 *	4,5 ± 0,1 **	62 ± 8,1 **	40,5 ± 1,3
Норма (здоровые крысы)	38,0 ± 0,9 **	25,0 ± 0,9 **	13,0 ± 0,9 **	3,4 ± 0,2 **	63,3 ± 4,1 *	44,1 ± 0,6 **

Обозначения: \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  – достоверность различий по сравнению с контролем (ВКД), принятым за 100% по каждому показателю; m – стандартная ошибка среднего.

дуремых пептидов, но максимальные — после действия пептида RERPGR. При этом после применения каждого из пептидов в плазме крови установлено их гипогликемическое действие, максимальное — при использовании RERVGR и RERGR.

При изучении действия пептидов спустя неделю после их последнего применения на фоне продолжающегося режима ВКД наблюдалась следующая картина: сохранялся повышенный фибринолиз, а именно: СФА была увеличена на 58% (RERPGR), 48% (REVRGR) и 33% (RERGR), НФА — на 80% (RERPGR), 70% (REVRGR) и 61% (RERGR) и ФФА — на 57% (RERPGR), 46% (REVRGR), 26% (RERGR); увеличивалась антикоагулянтная — на 15% (RERPGR), 21% (REVRGR), 12,5% (RERGR) и антитромбоцитарная активность — на 63,3% (RERPGR), 56,5% (REVRGR), 38% (RERGR); уровень глюкозы крови снизился на 23% (RERPGR), 29% (REVRGR) и на 35% (RERGR) по сравнению с контролем (таблица).

Таким образом, через 168 ч после прекращения введения пептидов в крови подопытных животных сохранялся повышенный фон антикоагулянтной, фибринолитической и антитромбоцитарной активности и достоверно снижался уровень глюкозы. Необходимо отметить, что после применения пептида RERPGR наблюдались максимальные антитромбоцитарный и фибринолитический эффекты.

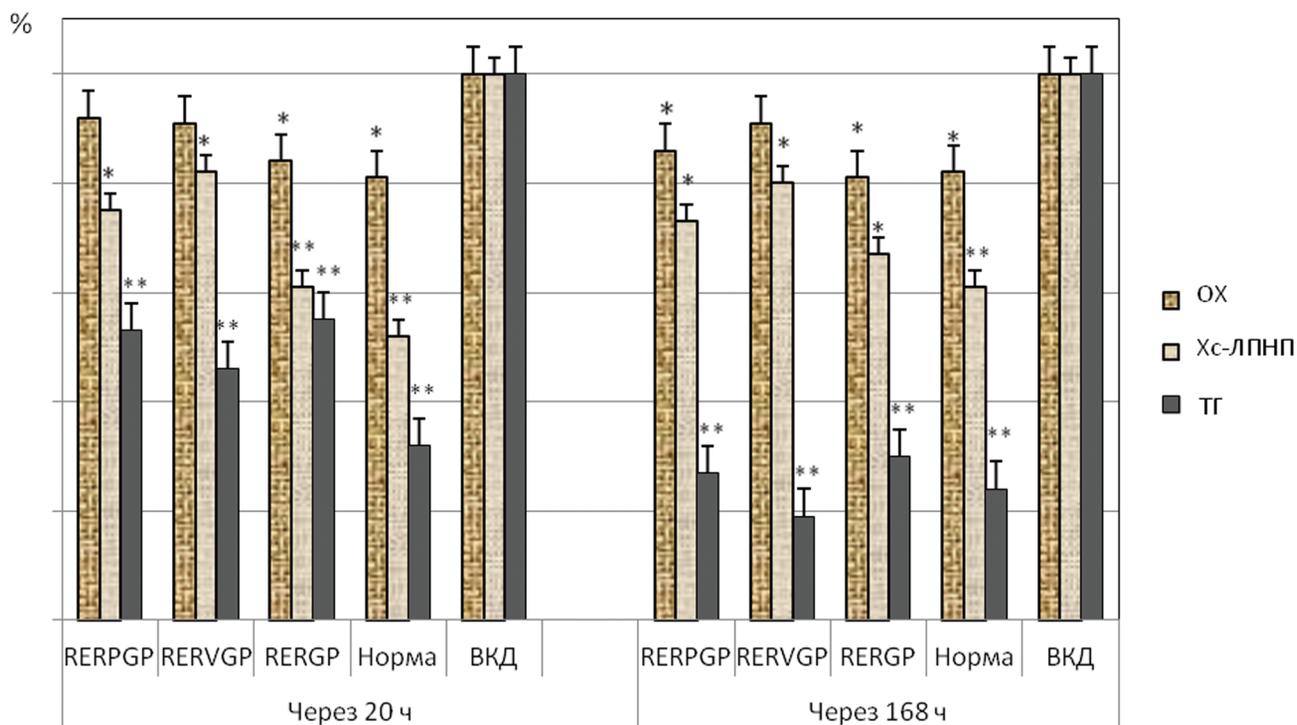
**Действие пептидов на показатели липидного профиля.** После многократного (7 раз) применения

пептидов RERPGR, REVRGR и RERGR (рис. 2) были меньшими, чем в контроле, содержание ОХ (на 8%–9%–16%, соответственно), Хс-ЛПНП (на 25%–18%–39%), уровень триглицеридов (на 47%–54%–45%). Эти эффекты сохранялись на протяжении 168 ч после последнего введения препаратов, причем к концу этого периода уровень триглицеридов был гораздо ниже, чем через 20 ч после введения.

Итак, представленные данные свидетельствуют о способности всех исследуемых пептидов улучшать параметры липидного профиля в условиях развития метаболического синдрома.

**Изменение массы тела крыс при действии пептидов.** Введение каждого из трёх исследуемых нами пептидов на фоне уже развившегося МС приводило или к замедлению роста массы тела (REVRGR и RERGR) или к его снижению (RERPGR): прирост массы тела у животных, которым вводили пептиды RERVGR и RERGR, был достоверно меньше, чем у крыс контрольной группы, на 85 и 96%, соответственно. А после применения пептида RERPGR крысы похудели на 13% (рис. 3).

Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что содержание крыс на ВКД, обогащенной жирами, углеводами и холестерином, приводило к нарушениям в углеводном и жировом обмене веществ, в результате чего в крови повышалось содержание общего холестерина, триглицеридов, атерогенных липопротеидов и глюкозы, что согласуется с ранее приведенными данными [1, 18]. Наряду



**Рис. 2.** Показатели общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП) и триглицеридов (ТГ) в крови крыс, содержащихся на ВКД, через 20 ч и 168 ч после интраназального 7-кратного применения пептидов RERPGR, REVRGR, RERGR.

\*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$

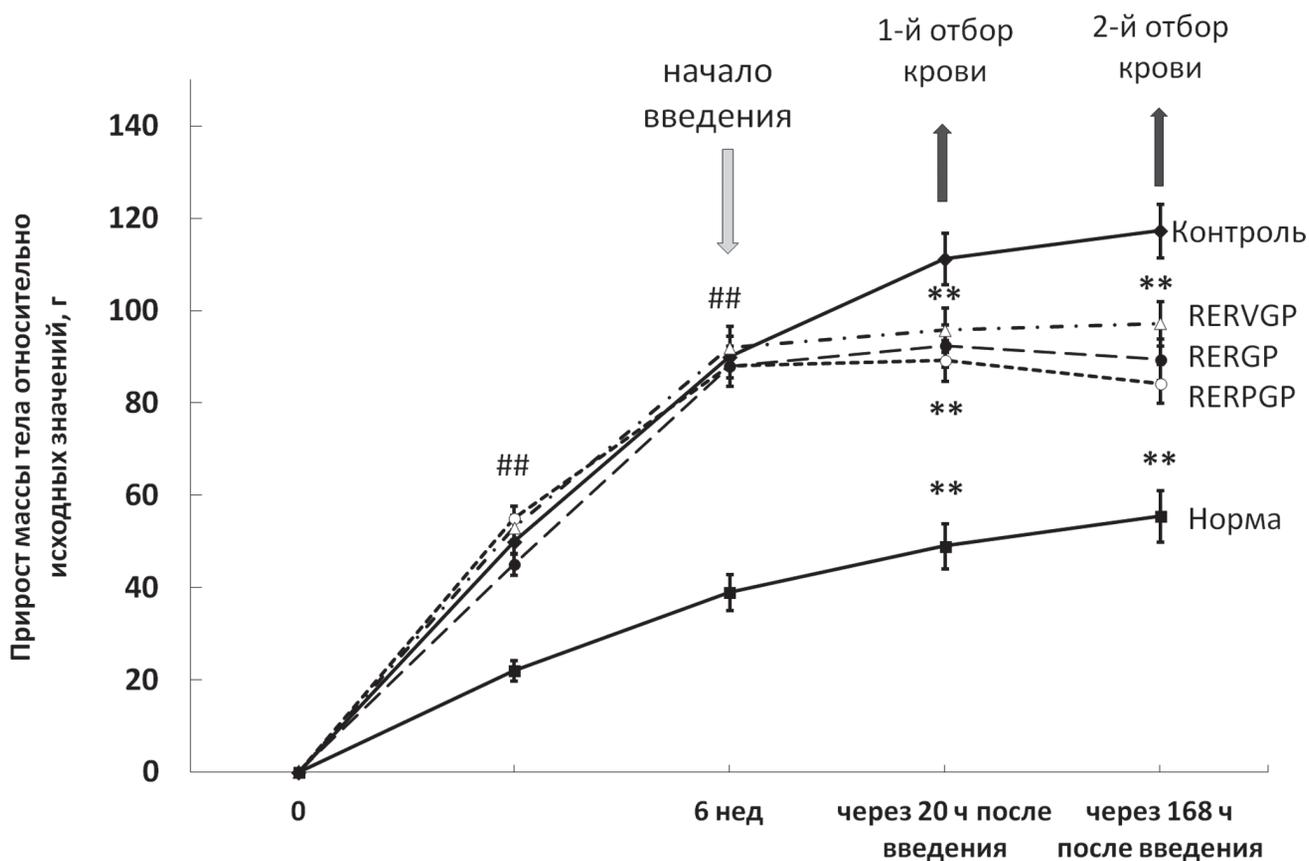


Рис. 3. Прирост массы тела животных в процессе проведения эксперимента.

\*\* $p < 0,01$  – достоверность различий по сравнению с контролем (ВКД); ## $p < 0,01$  – достоверность различий по сравнению с нормой

с этим у таких животных отмечалось нарушение и свёртываемости крови, что выражалось в ухудшении функций всех звеньев (антикоагулянтного, фибринолитического, антитромбоцитарного) противосвёртывающей системы крови. Возможно, это связано с таким компонентом, ответственным за жировое перерождение артериальной стенки, как цитокин из семейства аларминов HMGB1 (высокомобильный хромосомный белок 1), в результате чего в крови наблюдалась гиперкоагуляция и возникали тромботические осложнения [19], а возможно, и с повышением уровня факторов свёртывания и появлением в сосудах пристеночных жировых масс, клеточных компонентов крови и развитием фиброзной ткани с последующим сужением сосудов [20]. Все перечисленные признаки характеризовали развитие у экспериментальных животных МС, являющегося комплексным заболеванием, затрагивающим многие системы организма [18].

Исследованные нами препараты пептидов в этих условиях восстанавливали нормальные значения показателей глюкозы и липидного профиля крови. Это может быть обусловлено как гиполипидемическим действием самих пептидов, так и гиполипидемическим действием отдельных аминокислот, входящих в состав пептидов [21], а также присутствием в пептиде RERPGP глипролиновой группировки

Pro-Gly-Pro [3], поскольку данный пептид способствовал более значительному снижению массы тела крыс к концу эксперимента и проявлял в организме заметное фибринолитическое и антитромбоцитарное действие.

Известно, что пептиды, включающие аргинин в свою структуру, восстанавливают нормальные значения не только уровня глюкозы крови, но и показателей липидного профиля [2].

В наших экспериментах была установлена эффективность действия исследованных пептидов в предотвращении накопления жировой массы тела с одновременным положительным влиянием на параметры гемостаза в сторону активации функционального состояния противосвёртывающей системы крыс. Обнаруженный эффект, возможно, связан со способностью исследованных пептидов, подобно природному антикоагулянту гепарину, активировать липопротеидную липазу крови с последующим ухудшением атерогенных свойств крови. Этот механизм гиполипидемического действия выявлен и у лейцинсодержащих глипролинов (через модуляцию липидзависимой фосфолипазы A2) [22]. Кроме того, антикоагулянтный эффект пептидов обусловлен их способностью ингибировать тромбин [23]. Снижение агрегации тромбоцитов под действием исследованных пептидов, вероятно, об-

условлено их взаимодействием с рецепторами тромбоцитов, в частности, гликопротеином IIb–IIIa, с последующим ингибированием этих рецепторов [4].

Таким образом, в условиях моделирования МС у крыс исследованные нами пептиды (RERPGP, RERVGP, RERGP) проявляют корректирующий эффект, снижая до нормальных значений уровень ОХ, Хс-ЛПНП, ТГ, глюкозы крови и активируя

функциональное состояние противосвёртывающей системы крови. Они снижают массу тела подопытных животных и препятствуют накоплению новых жировых отложений в организме даже при содержании животных на ВКД. Из исследованных нами трёх пептидов пептид RERPGP вызывает максимальный противосвертывающий и гипохолестериновый эффект.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shubina T.A., Grigorjeva M.E., Lyapina L.A., Obergan T.Y., Myasoedov N.F., Andreeva L.A.* Hypoglycemic and anticoagulant effects of tetrapeptide Pro-Gly-Pro-Leu in hypercholesterolemia // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. Vol. 158. N 1. P. 30–33.
- Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A., Andreeva L.A., Myasoedov N.F.* Peptide regulation of metabolic processes under hypercholesterolemia conditions of an organism // *Biol. Bull.* 2015. Vol. 42. N 6. P. 546–555.
- Andreeva L.A., Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigor'eva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A.* Effect of the PRO-GLY-PRO peptide on hemostasis and lipid metabolism in rats with hypercholesterolemia // *Dokl. Biol. Sci.* 2013. Vol. 453. N 1. P. 333–335.
- Ferrell J.E., Martin G.S.* Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb–IIIa in platelets // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989. Vol. 86. N 7. P. 2234–2238.
- Gorbachisky I., Akpinar H., Assimios D.G.* Metabolic syndrome and urological diseases // *Rev. Urol.* 2010. Vol. 12. N 4. P. 157–180.
- Xiao C., Hsieh J., Adeli K., Lewis G.F.* Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011. Vol. 301. N 3. P. E429–E446.
- Баркаган З.С., Костюченко Г.И.* Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных // *Бюл. СО РАМН.* 2006. № 2 (120). С. 132–138.
- Watson T., Arya A., Sulke N., Lip G.Y.H.* Relationship of indices of inflammation and thrombogenesis to arrhythmia burden in paroxysmal arterial fibrillation // *Chest.* 2010. Vol. 137. N 4. P. 869–876.
- Kong X., Zhang D.Y., Wu H.B., Li F.X.* Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. Vol. 34. N 5. P. 693–698.
- Vila L., Rebollo A., Adalsteisson G.S., Alegre T.M., Merlos M., Roglans N., Laguna J.C.* Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed rats at atorvastatin treatment // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011. Vol. 251. N 1. P. 32–40.
- Малинин В.В.* Средство для коррекции метаболического синдрома // Патент России № 2458935. 2012. Бюл. № 23.
- Коркушко О.В., Чиждова В.П., Шатило В.Б., Хавинсон В.Х.* Эффективность тетрапептида Панкраген форме у пожилых людей с преддиабетическими нарушениями углеводного обмена // *Усп. геронтол.* 2013. Т. 26. № 2. С. 297–308.
- Жернакова Ю.В., Мычка В.Б., Чазова И.Е.* Место комбинированной терапии в лечении больных с метаболическим синдромом // *Кардиоваск. тер. проф.* 2010. Т. 9. № 4. С. 1–4.
- Stief T.W.* Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2007. Vol. 13. N 2. P. 146–153.
- Vasiljević A., Buzadžić B., Korać A., Petrović V., Janković A., Korać B.* Beneficial effects of L-arginine-nitric oxide – producing pathway in rats treated with alloxan // *J. Physiol.* 2007. Vol. 584. N 3. P. 921–933.
- Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A.* Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia // *Pathophysiol.* 2016. Vol. 23. N 1. P. 27–33.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А.* Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Ikee R., Hamasaki Y., Oka M., Maesato K., Mano T., Moriya H., Ohtake T., Kobayashi S.* Clinical: high-density lipoprotein cholesterol and left ventricular mass index in peritoneal dialysis // *Perit. Dial. Int.* 2008. Vol. 28. N 2. P. 611–616.
- Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С.* Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза // *Вестн. гематол.* 2013. Т. 9. № 2. С. 29–33.
- Glaudemans A.W., Start R.H., Bozzao A., Bonanno E.* Molecular imaging in atherosclerosis // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2010. Vol. 37. N 12. P. 2381–2397.
- Meade L.T.* Practical use of exenatide and pramlintide for the treatment of type 2 diabetes // *J. Pharm. Pract.* 2009. Vol. 22. N 6. P. 540–545.
- Shabalina A.A., Lyapina L.A., Rochev D.L., Kostyreva M.V., Tanashyan M., Suslina T.A.* In vitro lipid lowering and fibrinolytic effects of regulatory leucine containing glyprolines in human blood // *Biol. Bull.* 2015. Vol. 42. N 1. P. 74–77.
- Hasan A.A., Wernock M., Nieman M., Srikanth S., Mahdi F., Krishnan R., Tulinsky A., Schmaier A.* Mechanisms of Arg-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin // *J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. Vol. 285. N 1. P. 183–193.

Поступила в редакцию  
20.02.2017  
Принята к печати  
06.03.2017

## PHYSIOLOGY

## CORRECTION OF MANIFESTATIONS OF THE EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME IN RATS WITH SOME ARGININE-CONTAINING PEPTIDES

L.A. Lyapina<sup>1,\*</sup>, M.E. Grigorjeva<sup>1</sup>, T.Y. Obergan<sup>1</sup>, N.F. Myasoedov<sup>2</sup>, L.A. Andreeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of defense systems of the blood, Department of human and animal physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1/12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Institute of molecular genetics. Russian Academy of Sciences. Kurchatov sq. 2, Moscow, 123182, Russia

\*e-mail: lyapinal@mail.ru

An important task of biomedical research is the functional characterization of new regulatory glyproline peptides, which are able to provide regulatory effect on the functional state of the haemostatic system, lipid and carbohydrate metabolism in the organism. In the present study used a model of experimental metabolic syndrome that involves continuous feeding rats of high calorie food. This leads to increased clotting, glucose concentration, levels of total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides in the blood and to the development of obesity. 6 weeks after development of metabolic syndrome arginine-containing peptides (Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro, Arg-Glu-Arg-Val-Gly-Pro, Arg-Glu-Arg-Gly-Pro) were administrated to rats intranasal way once daily for 7 days. It was found that these peptides have the unique combined effects on organism, because they normalized the parameters of lipid metabolism, haemostatic system and the concentration of glucose in the blood. This corrective effect of the peptides was detected 20 h after the last drug administration and persisted for 168 h even in the continued maintenance of rats on a high-calorie diet. The investigated glyproline can be attributed to the therapeutic normoglycemic and lipid-lowering drugs. They block the accumulation of new fat deposits in the body and also have anticoagulant and antithrombotic effects in case of the disturbances of carbohydrate and fat metabolism. The most pronounced and stable positive effects on the organism it was established for peptide Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro.

**Key words:** *arginine-containing peptides, metabolic syndrome, hemostasis, lipid profile, blood glucose*

**Сведения об авторах**

Ляпина Людмила Анисимовна — проф., докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: lyapinal@mail.ru

Григорьева Марина Евгеньевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Оберган Тамара Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: tobergan@mail.ru

Мясоедов Николай Фёдорович — академик РАН, докт. биол. наук, зам. директора Института молекулярной генетики РАН. Тел. 8-499-196-00-02; e-mail: nfm@img.ras.ru

Андреева Людмила Александровна — руководитель сектор регуляторных пептидов Института молекулярной генетики РАН. Тел. 8-499-196-16-02; e-mail: landr@img.ras.ru

## ЦИТОЛОГИЯ

УДК 57.085.23

## ДЕФОРМАЦИЯ ЯДЕР КЕРАТИНОЦИТОВ НАСАТ НА ОРИЕНТИРОВАННЫХ ВОЛОКНИСТЫХ СУБСТРАТАХ

Е.Р. Павлова<sup>1</sup>, Д.В. Багров<sup>2,\*</sup>, Ю.В. Храмова<sup>3</sup>, Д.В. Клинов<sup>1</sup>, К.В. Шайтан<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,  
Россия, 119435, г. Москва, Малая Пироговская, д. 1а;

<sup>2</sup>кафедра биоинженерии и <sup>3</sup>кафедра эмбриологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: dbagrov@gmail.com

Рельеф субстрата оказывает влияние на форму клеток, направление и скорость их миграции, форму клеточных ядер, уровень экспрессии генов. Для исследования этого влияния используют субстраты с заданным рельефом и химической структурой. В данной работе исследовано состояние ядер и актинового цитоскелета кератиноцитов человека линии НАСАТ на субстратах (матриксах) из поли(ε-капролактона), полученных методом электроспиннинга. Были приготовлены и охарактеризованы два типа волокнистых матриксов. В изотропных матриксах волокна расположены хаотично, а в анизотропных большинство волокон располагаются однонаправленно. Показано, что на анизотропных матриксах в клетках НАСАТ ядра более вытянуты, чем на изотропных, а актиновые фибриллы преимущественно ориентированы вдоль одного направления.

**Ключевые слова:** *волокнистый субстрат, контактное ориентирование, форма клеточного ядра, деформация клеточного ядра, электроспиннинг, ориентированные волокна*

Форма и размер клеточного ядра зависят от множества факторов, а вариации этих параметров отражают сложные физиологические процессы [1]. Взаимосвязь между механическими напряжениями в клетке (в первую очередь, на волокнах цитоскелета) и состоянием ядра является предметом активного изучения [2, 3]. Эту взаимосвязь можно рассматривать как пример контактного ориентирования (contact guidance) — ориентации эукариотических клеток на анизотропных субстратах. Оно проявляется в изменении формы клеток, регулирует направление и скорость их миграции [4], влияет на распластывание, выживаемость и пролиферацию [5, 6], а также на другие процессы [7].

Обычно для исследования контактного ориентирования используют субстраты, полученные с помощью высокоточной обработки поверхности, например, методами фото- и электронно-лучевой литографии, химического и ионного травления и т.п. [8]. Менее распространенными субстратами для изучения контактного ориентирования являются матриксы (полимерные субстраты для культивирования клеток), полученные методом электроспиннинга [9, 10]. Он предназначен для того, чтобы формировать пленки и трубки, состоящие из полимерных волокон с диаметрами ~100 нм – 1 мкм, причём они могут располагаться либо хаотично, либо упорядоченно в зависимости от условий формирования. Интерес к электроспиннингу связан с возможностями его использования в тканевой

инженерии и разработке систем контролируемого высвобождения лекарств [11]. Электроспиннинг используют для создания нановолокон из биосовместимых полимеров; при этом стараются имитировать структуру нативного межклеточного матрикса, чтобы обеспечить оптимальные условия жизнедеятельности клеток [12].

В данной работе методом электроспиннинга получены матриксы (пленки), состоящие из биосовместимого полимера поли(ε-капролактона) (ПКЛ), имеющие различную ориентацию волокон. На примере кератиноцитов человека линии НАСАТ, выращенных на этих матриксах, показано, что ориентация волокон ПКЛ влияет на форму ядра.

### Материалы и методы

**Электроспиннинг.** Матриксы из раствора поли(ε-капролактона) (“LACTEL”, США) в 1,1,1,3,3,3-гексафторизопропанол (“ПиМ-Инвест”, Россия) с концентрацией 100 мг/мл были получены методом электроспиннинга на установке Nanofiber Electrospinning Unit (Китай). Волокна осаждали на коллектор, в результате чего они формировали матрикс толщиной 50–150 мкм. Для получения неориентированных матриксов (состоящих из волокон, ориентированных случайным образом) в качестве коллектора использовалась металлическая пластина, а для получения ориентированных матриксов (состоящих из волокон, которые преимущественно

направлены вдоль одной линии) — два параллельных лезвия. Расстояние и разность потенциалов между иглой шприца и коллектором в обоих случаях были равны 30 см и 30 кВ, соответственно. Подача полимерного раствора осуществлялась с помощью шприцевого насоса со скоростью 1 мл/ч.

**Электронная микроскопия.** Фрагменты пленок с размером  $\sim 5 \times 5$  мм исследовали на сканирующем электронном микроскопе Hitachi TM3000 (Hitachi, Япония). Образцы закрепляли на двухсторонний скотч и покрывали тонким слоем металла (сплава золота и палладия), чтобы обеспечить стекание электрического заряда. Исследование проводили при ускоряющем напряжении 15 кВ. Изображения анализировали с помощью программы Fiji с использованием программных модулей DiameterJ и OrientationJ [13, 14].

**Культивирование клеток.** Иммуортиализованные кератиноциты человека линии HaCaT, полученные из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, культивировали на поверхности пластиковых чашек Петри в полной ростовой среде (DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 4 mM L-глутамином (ПанЭко, Россия) и гентамицином (53 мкг/мл, Борисовский завод медицинских препаратов, Беларусь). Смену среды производили ежедневно. При пассировании среду выливали, клетки 2–3 раза промывали раствором версена (ПанЭко, Россия) для удаления следов сыворотки, затем заливали смесью растворов трипсина и ЭДТА (0,25% трипсина, 0,53 мМоль ЭДТА, ПанЭко, Россия), и убирали в инкубатор на 5 мин. Клетки, потерявшие контакт с пластиковой поверхностью, отбирали с помощью автоматической пипетки, помещали в пробирку с каплей сыворотки для нейтрализации трипсина и центрифугировали 7 мин при 1000 об/мин. Затем выливали супернатант, ресуспендировали клетки в полной ростовой среде и рассаживали на новые чашки.

**Конфокальная микроскопия.** За сутки до начала эксперимента матриксы нарезали на квадраты  $1 \times 1$  см и помещали в лунки 4-луночного планшета, которые заполняли полной ростовой средой. Клетки снимали с поверхности чашек Петри при помощи раствора версена и смеси растворов трипсина и ЭДТА, как описано выше, после чего измеряли концентрацию клеток в суспензии при помощи автоматического счетчика клеток Scepter 2.0 (Millipore, США). Клетки высаживали на заранее подготовленные матриксы в концентрации 150000 клеток на лунку. Для повышения вероятности прикрепления клеток к матриксам в экспериментах использовали планшеты с низкоадгезивной поверхностью. Клетки культивировали в течение 24 ч.

После окончания культивирования проводили окрашивание флуоресцентными красителями Hoechst 33258, иодид пропидия и Calcein AM (Ther-

moFisher Scientific, США) с целью выявления живых и погибших клеток в культуре. Для оценки состояния цитоскелета клеток, выросших на матриксах, проводили окрашивание на актин при помощи флуоресцентного красителя ActinRed 555 (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. После окрашивания матриксы с клетками отмывали в чистой среде, размещали между стеклами и исследовали на конфокальном микроскопе Fluoview FV10i (Olympus, Япония). Изображения анализировали с помощью программы Fiji.

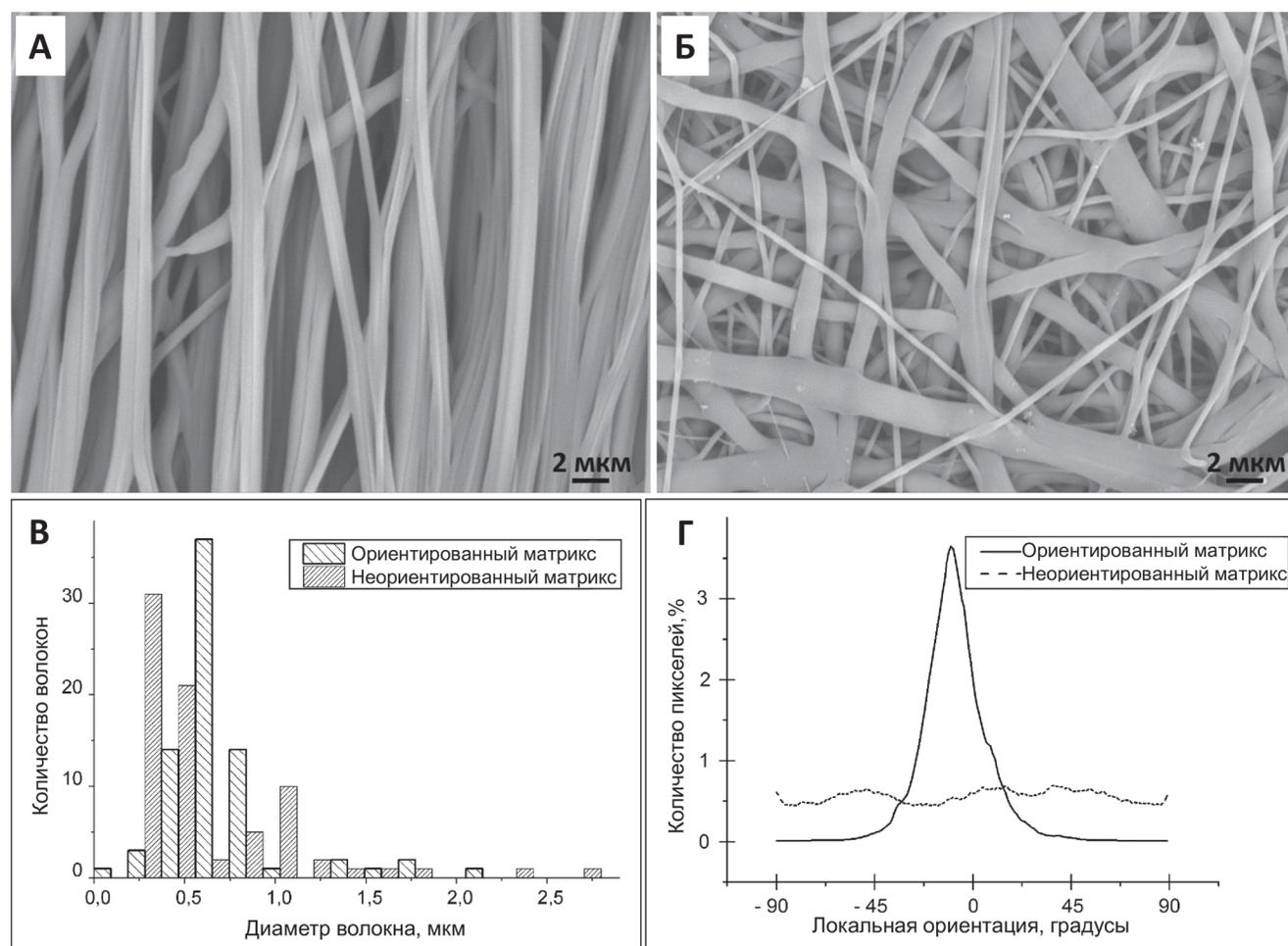
**Статистическую обработку** результатов проводили с использованием программы Origin 8.6.1 (OriginLab). Для сравнения распределений использовали критерий Манна–Уитни.

### Результаты и обсуждение

Морфология поверхности матриксов из ПКЛ была изучена методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 1 А, Б). Для неориентированных матриксов характерно бимодальное распределение волокон по размерам (рис. 1 В): в составе матрикса присутствуют волокна с характерными диаметрами ( $300 \pm 100$  нм и  $1,0 \pm 0,2$  мкм). Аналогичное бимодальное распределение наблюдалось при электроспиннинге полиэтиленоксида из водного раствора [15]. Предположительно, оно может быть связано с интенсивным расщеплением основной струи полимерного раствора на множество более мелких. Для ориентированных матриксов распределение волокон по диаметрам (рис. 2 В) имеет единственный пик вблизи среднего значения 600 нм. Разница в диаметрах может повлиять на адгезию и пролиферацию клеток, но практически не влияет на контактное ориентирование [16].

Для описания направлений волокон использовали программный модуль OrientationJ [14] программы Fiji. Вначале на изображении выделяли волокна, чтобы отделить их от фона. Вокруг каждого пикселя волокна выбирали окрестность определенного размера (в нашем случае — диаметром в 3 пикселя). Внутри этой окрестности вычисляли направление градиента изображения, т.е. определяли направление, вдоль которого яркость пикселей изменяется сильнее всего. При этом определяли и направление, перпендикулярное градиенту — вдоль него яркость изменяется слабее всего. Это направление называется локальной ориентацией, оно близко к направлению волокна. Таким образом, направление приписывали не волокнам, а отдельным пикселям на их изображении. Локальную ориентацию (характеристику направления волокон), которая характеризует угол между волокном и вертикальной границей кадра, измеряли в градусах. Распределение значений локальной ориентации представлено на рис. 1 Г.

В неориентированном матриксе волокна расположены хаотично, то есть под случайными углами



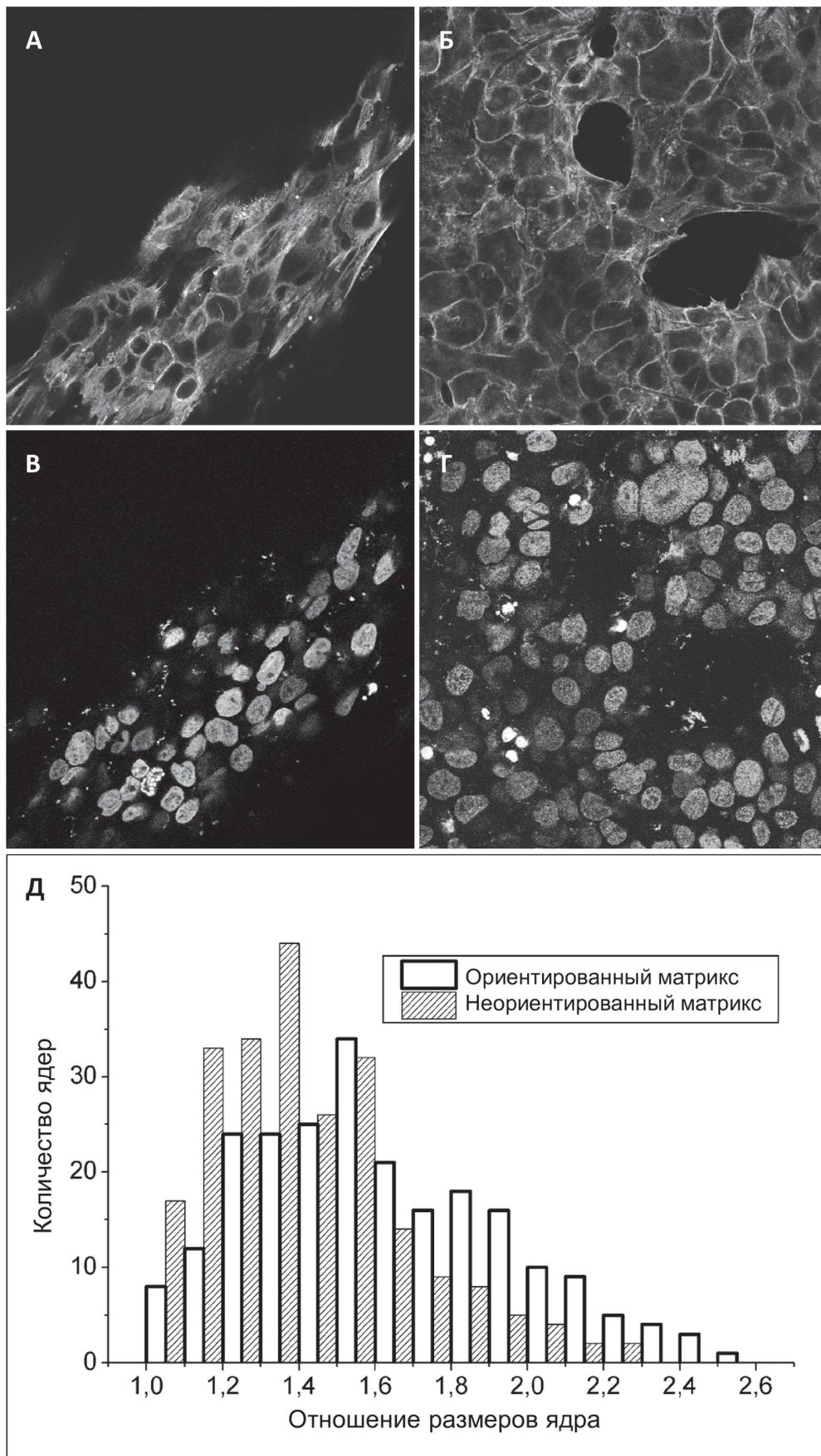
**Рис. 1.** Поверхность волокнистых матриц и её характеристики. А – ориентированный матрикс из ПКЛ, Б – неориентированный матрикс из ПКЛ, В – распределение диаметров волокон в матриксах из ПКЛ, Г – распределение ориентации волокон в матриксах их ПКЛ

друг к другу. Поэтому распределение значений локальной ориентации не имеет пиков, все направления равновероятны. Напротив, в ориентированном матриксе волокна преимущественно имеют одно направление и образуют близкие углы со сторонами изображения. Для такого матрикса распределение значений локальной ориентации имеет единственный пик.

На данных матриксах были выращены кератиноциты человека линии HaCaT. После культивирования в течение 24 ч клетки оставались живыми как на ориентированном, так и на неориентированном матриксе, о чем свидетельствовало положительное окрашивание Calcein AM и отрицательное окрашивание иодидом пропидия. Погибали только единичные клетки, не распластавшиеся по матриксу и сохранившие шарообразную форму, характерную для клеток в суспензии. По данным, полученным методом лазерной конфокальной микроскопии, клетки, выращенные на ориентированных матриксах, изменяют свою форму, вытягиваясь вдоль волокон. На рис. 2 А, Б видно, что волокна актинового цитоскелета клеток, выращенных на ориентированном матриксе, выстроены вдоль одного и того же направления. Актиновый цитоскелет играет одну

из важнейших ролей в контактном ориентировании: по нему механическое напряжение передается внутрь клетки.

В данном случае направление волокон матрикса, на котором культивируют клетки, влияет на форму клеточного ядра (рис. 2 В, Г). Для количественного описания этого явления для каждой клетки выбирали ее оптический срез, на котором ядро имеет наибольшую площадь и четкие границы. С помощью программы Fiji изображение ядра аппроксимировали эллипсом и вычисляли отношение большой оси эллипса к малой, что соответствует отношению наибольшего размера ядра к наименьшему (далее просто “отношение размеров ядра”). Эти отношения были вычислены для 230 ядер клеток, выращенных на ориентированных матриксах, и для такого же количества – на неориентированных. Были сформированы два набора чисел, на рис. 2 Д приведены соответствующие им гистограммы. Клеточные ядра обычно не являются строго круглыми, поэтому для клеток, выращенных на неориентированном матриксе, максимум распределения соответствует отношению размеров ядер, равному 1,4. Для клеток, выращенных на ориентированном матриксе, распределение шире



**Рис. 2.** Клетки NaCaT, выращенные на волокнистых матриксах из ПКЛ. А, Б – изображения цитоскелета клеток NaCaT, окрашенного ActinRed555, на ориентированных (А) и неориентированных (Б) матриксах, В, Г – изображения ядер клеток NaCaT, окрашенных Hoechst 33258, на ориентированных (В) и неориентированных (Г) матриксах, Д – отношение большего размера ядра к меньшему для клеток, выращенных на матриксах из ПКЛ

и сдвинуто вправо, максимум приходится на 1,5; кроме того, резко возрастает доля значений, больших, чем 1,6. По непараметрическому критерию Манна-Уитни эти распределения достоверно различаются ( $p < 0,0001$ ), т.е. клеточные ядра на ориентированных матриксах значительно деформированы.

Форма клеток связана с организацией цитоскелета и компактизацией хроматина, она влияет на деление и рост клеток, экспрессию генов, развитие апоптоза [3]. По данным, полученным методом конфокальной микроскопии, на поверхности ориентированных пленок из ПКЛ клетки вытягиваются вдоль волокон, причем изменение формы сопровождается деформацией ядра. На качественном уровне этот эффект можно объяснить через изменение распределения сил, действующих на цитоскелет. Именно волокна цитоскелета, соединенные линкерами с трансмембранными белками, которые взаимодействуют с межклеточным матриксом, передают механические напряжения, действующие на поверхности, в цитоплазму и к ядру. Волокна актинового цитоскелета связаны с интегринами через молекулярные мостики из актин-связывающих белков, таких как таллин, тензин, винкулин, паксиллин и др. За связь волокон цитоскелета с кадгеринами также отвечают специализированные белки, например, катенины. Эти белковые системы обеспечивают механическую связь между волокнами цитоскелета и межклеточным матриксом [17].

Механическое взаимодействие между волокнами цитоскелета и ядром также обеспечивается специальными белками. Они необходимы для миграции и позиционирования ядра в клетке [18]. Наиболее важный из них – это комплекс белков LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton), линкер между ядерным матриксом и цитоскелетом. Он передает на ядро механические напряжения, которые могут вызывать его деформацию, влиять на транспорт через ядерную мембрану, вызывать реорганизацию ядерного матрикса и хроматина [17]. Комплекс LINC включает в себя белки семейства неспринов, SUN1, SUN2 и белки ламины. Несприны локализуются на наружной ядерной мембране и являются первой точкой контакта между ядром и цитоскелетом. Несприн-1 и несприн-2 связываются непосредственно с актином, несприн-4 связывает ядро с микротрубочками через моторный белок кинезин-1. Несприн-3 через цитолинкер плектин связывает ядерную мембрану с промежуточными филаментами. Плектин не только соединяет промежуточные филаменты между собой и с ядерной мембраной, но и с актиновым цитоскелетом и интегриновыми рецепторами. Для кератиноцитов показано, что недостаток плектина приводит к деформации ядер клеток в связи с нарушением формирования сети промежуточных

филаментов, состоящих в данном типе клеток из кератина [19]. Для проведения настоящего исследования были выбраны именно кератиноциты, так как данный тип клеток обладает высокой пролиферативной активностью в культуре, а также является удобной моделью для изучения передачи механического сигнала от матрикса к внутренним структурам клетки. Эпителиальные клетки соединены между собой клеточными контактами, благодаря чему осуществляются координация клеточных сокращений и перестройки цитоскелета.

Деформацию ядер эукариотических клеток, выращенных на матриксе из ПКЛ, ранее наблюдали в экспериментах на первичных культурах мезенхимных стволовых клеток человека и фиброхондроцитов [10, 20]. Отличие нашей работы состоит в том, что мы выращивали клетки непосредственно на ПКЛ, не модифицируя его поверхность для улучшения адгезии. При этом эффекты контактного ориентирования должны были бы проявляться слабее, чем на модифицированном ПКЛ [9]. Тем не менее, деформация ядер наблюдалась, т.е. немодифицированная поверхность волокнистого ПКЛ тоже подходит для изучения контактного ориентирования.

Таким образом, мы показали, что в клетках NaCaT, выращенных на ориентированных матриксах, наблюдается деформация ядра. На изотропном матриксе ядра тоже вытянуты (их проекции являются овалами, а не кругами), но их деформация выражена менее явно. Качественные модели, объясняющие это явление, были предложены для описания клеток на субстратах с микровыступами [21–23]. Согласно первой модели, при расплывании клетки по субстрату волокна цитоскелета натягиваются, при этом те из них, которые проходят над ядром, начинают толкать его в сторону субстрата. Согласно второй модели, сила, прижимающая ядро к субстрату, возникает за счет актиновых волокон, которые тянутся одним концом к мембране, а другим – к ядру. Согласно третьей модели, форма ядра регулируется актиновым “конвертом”, расположенным вокруг ядра. Однако ни детальный механизм деформации ядер, вызванной особенностями рельефа субстрата, ни его физиологическое значение пока не описаны. Если дальнейшие эксперименты позволят установить вызванные рельефом субстрата изменения уровней экспрессии генов, эти знания можно будет использовать для направленной дифференцировки клеток и моделирования патологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01108 А) с использованием оборудования, приобретенного на средства Программы развития Московского государственного университета до 2020 г.

## СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Webster M., Witkin K.L., Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly // *J. Cell Sci.* 2009. Vol. 122. N 10. P. 1477–1486.
2. Versaevel M., Grevesse T., Gabriele S. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3. Article number 671.
3. Lunova M., Zablotskii V., Dempsey N.M., Devillers T., Jirsa M., Syková E., Kubinová Š., Lunov O., Dejneka A. Modulation of collective cell behaviour by geometrical constraints // *Integr. Biol.* 2016. Vol. 8. N 11. P. 1099–1110.
4. Doyle A.D., Wang F.W., Matsumoto K., Yamada K.M. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration // *J. Cell Biol.* 2009. Vol. 184. N 4. P. 481–490.
5. Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death // *Science.* 1997. Vol. 276. N 5317. P. 1425–1428.
6. Gaharwar A.K., Nikkha M., Sant S., Khademhosseini A. Anisotropic poly (glycerol sebacate)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers promote endothelial cell guidance // *Biofabrication* 2014. Vol. 7. N 1. Article number 15001.
7. Lamers E., Walboomers X.F., Domanski M., Prodanov L., Melis J., Luttge R., Winnubst L., Anderson J.M., Gardeniers H.J.G.E., Jansen J.A. In vitro and in vivo evaluation of the inflammatory response to nanoscale grooved substrates // *Nanomed.: Nanotech., Biol. Med.* 2012. Vol. 8. N 3. P. 308–317.
8. Norman J. J., Desai T.A. Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds // *Ann. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 34. N 1. P. 89–101.
9. Ma Z., He W., Yong T., Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation // *Tissue Eng.* 2005. Vol. 11. N 7–8. P. 1149–1158.
10. Heo S.-J., Nerurkar N.L., Baker B.M., Shin J.-W., Elliott D.M., Mauck R.L. Fiber stretch and reorientation modulates mesenchymal stem cell morphology and fibrous gene expression on oriented nanofibrous microenvironments // *Ann. Biomed. Eng.* 2011. Vol. 39. N 11. P. 2780–2790.
11. Sill T.J., von Recum H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29. N 13. P. 1989–2006.
12. Mo X. M., Xu C.Y., Kotaki M., Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation // *Biomaterials.* 2004. Vol. 25. N 10. P. 1883–1890.
13. Hotaling N.A., Bharti K., Kriel H., Simon C. G. DiameterJ: A validated open source nanofiber diameter measurement tool // *Biomaterials.* 2015. Vol. 61. P. 327–338.
14. Rezakhanlaha R., Agianniotis A., Schrauwen J.T.C., Griffa A., Sage D., Bouten C.V.C., van de Vosse F.N., Unser M., Stergiopoulos N. Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy // *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2012. Vol. 11. N 3–4. P. 461–473.
15. Deitzel J.M., Kleinmeyer J., Harris D., Beck Tan N.C. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles // *Polymer.* 2001. Vol. 42. N 1. P. 261–272.
16. Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. N 15. P. 2603–2610.
17. Wang N., Tytell J.D., Ingber D.E. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. Vol. 10. N 1. P. 75–82.
18. Lombardi M.L., Jaalouk D.E., Shanahan C.M., Burke B., Roux K.J., Lammerding J. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. N 30. P. 26743–26753.
19. Almeida F.V., Walko G., McMillan J.R., McGrath J.A., Wiche G., Barber A.H., Connelly J.T. The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes // *J. Cell Sci.* 2015. Vol. 128. N 24. P. 4475–4486.
20. Nathan A.S., Baker B.M., Nerurkar N.L., Mauck R.L. Mechano-topographic modulation of stem cell nuclear shape on nanofibrous scaffolds // *Acta Biomater.* 2011. Vol. 7. N 1. P. 57–66.
21. Badique F., Stamov D.R., Davidson P.M., Veuillet M., Reiter G., Freund J.N., Franz C. M., Anselme K. Directing nuclear deformation on micropillared surfaces by substrate geometry and cytoskeleton organization // *Biomaterials.* 2013. Vol. 34. N 12. P. 2991–3001.
22. Davidson P.M., Fromigué O., Marie P.J., Hasirci V., Reiter G., Anselme K. Topographically induced self-deformation of the nuclei of cells: Dependence on cell type and proposed mechanisms // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. Vol. 21. N 3. P. 939–946.
23. Khataou S.B., Hale C.M., Stewart-Hutchinson P.J., Patel M.S., Stewart C.L., Searson P.C., Hodzic D., Wirtz D. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106. N 45. P. 19017–19022.

Поступила в редакцию

30.01.2017

Принята к печати

02.03.2017

## CYTOLOGY

## NUCLEI DEFORMATION IN HACAT KERATINOCYTES CULTIVATED ON ALIGNED FIBROUS SUBSTRATES

*E.R. Pavlova*<sup>1</sup>, *D.V. Bagrov*<sup>2,\*</sup>, *Yu.V. Khramova*<sup>3</sup>, *D.V. Klinov*<sup>1</sup>, *K.V. Shaitan*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency,*

*1a Malaya Pirogovskaya ul., 119435, Moscow, Russian Federation;*

<sup>2</sup>*Department of Bioengineering and* <sup>3</sup>*Department of Embryology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1-12 Leninskiye Gory, 119234, Moscow, Russia*

*\*e-mail: dbagrov@gmail.com*

Substrate topography influences cell shape, direction, and rate of migration, nucleus shape, gene expression levels. This influence is commonly studied using substrates with pre-defined surface structure and chemical composition. In the current work, we studied the state of HaCaT keratinocytes nuclei and actin cytoskeleton on poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds obtained by electrospinning. Two types of fibrous scaffolds were prepared and characterized. In the random scaffolds the fibers were arranged in a non-systematic fashion, but in the aligned scaffolds most of the fibers had the same direction. When cultured on the aligned scaffolds, HaCaT cells exhibited oriented actin fibers and had more elongated nuclei.

**Key words:** *fibrous scaffold, contact guidance, cell nucleus shape, cell nucleus deformation, electrospinning, aligned fibers*

**Сведения об авторах**

*Павлова Елизавета Робертовна* – лаборант лаборатории медицинских нанотехнологий ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Тел.: 8-499-246-48-43; e-mail: elizaveta.r.pavlova@phystech.edu

*Багров Дмитрий Владимирович* – канд. физ-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dbagrov@gmail.com

*Храмова Юлия Владимировна* – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-00; e-mail: yul.khramova@gmail.com

*Клинов Дмитрий Владимирович* – канд. физ-мат. наук, зав. лабораторией медицинских нанотехнологий ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Тел.: 8-499-246-48-43; e-mail: klinov.dmitry@mail.ru

*Шайтан Константин Вольдемарович* – докт. физ-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaitan\_49@yandex.ru

## ЭКОЛОГИЯ

УДК 581.13

УГЛЕКИСЛОТНЫЙ ГАЗООБМЕН ХВОИ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ  
В ЮЖНОТАЁЖНОМ ЕЛЬНИКЕ

А.К. Юзбеков\*, Д.Г. Замолдчиков

Кафедра общей экологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: uak2003@mail.ru

Путём анализа динамики углекислотного газообмена хвои ели европейской (*Picea abies* L.) и факторов внешней среды в течение нескольких сезонов установлена прямая линейная зависимость интенсивности фотосинтеза от температуры воздуха и освещённости (коэффициенты корреляции составили 0,860 ( $p < 0,001$ ) и 0,704 ( $p < 0,001$ ), соответственно). Выявлено, что сезонный максимум нетто-фотосинтеза наблюдается при температуре 23–25°C; с понижением оптимума температуры отмечено уменьшение интенсивности ассимиляции CO<sub>2</sub>. На основе разработанной модели воздействий внешних факторов на интенсивность фотосинтеза показано, что в совокупности колебания температуры и освещённости позволяют объяснить 82% вариации интенсивности фотосинтеза; при этом температура воздуха оказывает наиболее сильное влияние на этот процесс. Согласно расчётам, величина нетто-фотосинтеза превышала уровень светового дыхания в три раза, что свидетельствует о положительном углекислотном балансе хвои ели европейской.

**Ключевые слова:** сезонная динамика, ель европейская, нетто-фотосинтез, дыхание, температура, освещённость

Исследование углекислотного газообмена древесных пород – эдификаторов лесных сообществ в последние годы привлекает пристальное внимание не только потому, что газообмен – интегральный показатель физиологического состояния дерева, но и благодаря значительной роли лесных экосистем в смягчении изменений климата, обусловленных ростом атмосферных концентраций диоксида углерода (CO<sub>2</sub>) и других парниковых газов [1]. При этом, если размеры углеродных пулов в лесной экосистеме увеличиваются, то создается сток углекислого газа из атмосферы, если уменьшаются, то в конечном итоге образуются источники парниковых газов. Из углеродных пулов главным поглотителем углерода является фитомасса (71,8%); на долю мёртвой древесины, подстилки и почвы приходится 7,2%, 3,6% и 17,4%, соответственно [2]. Роль бореальных лесов в регуляции газового состава наглядно подтверждается сезонными колебаниями концентрации CO<sub>2</sub> в северном полушарии: в вегетационный период она снижается, а в холодное время начинает расти. Если учесть, что в растительности и верхнем слое почв бореальных лесов сосредоточено более 22% глобальных запасов резервуара углерода суши, то их вклад в круговорот углерода на планете должен быть существенным [3]. Важным элементом глобального углеродного бюджета являются леса России [2,4].

Объём и динамика резервуара углерода лесных экосистем обусловлены соотношением продукции и деструкции органического вещества. При этом

сток углерода определяется способностью фитоценозов поглощать CO<sub>2</sub> в процессе фотосинтеза. Старовозрастные леса важны как хранилища большого количества запасенного углерода [5]. Исследования показали, что в старых лесах углеродный баланс, как правило, положительный, и вероятность их функционирования как источников углерода не увеличивается с возрастом, а определяется изменением климатических условий [6].

Цель наших исследований состояла в изучении динамики углекислотного газообмена хвои ели европейской (*Picea abies* L.) старовозрастного древостоя южнотаёжного ельника и выявлении его связи с факторами внешней среды.

### Материалы и методы

Исследования проводили на экспериментальном полигоне “Таёжный лог” Валдайского филиала Государственного гидрологического института, расположенном на территории национального парка “Валдайский” Новгородской области.

CO<sub>2</sub>-газообмен регистрировали в тёплый сезон 2013–2015 гг, в течение трёх дней третьей декады каждого месяца, в полуденные часы, в трёх повторностях с интервалом 10 мин, в наиболее благоприятных для процесса фотосинтеза условиях освещения и температуры.

По своему ботанико-географическому положению район полевых работ находится на границе зон южной тайги и хвойно-широколиственных лесов; согласно лесорастительному делению он от-

носится к району хвойно-широколиственных лесов Европейской части РФ.

Измерения проводили на пробной площади, заложенной в старовозрастном (110–120 лет) ельнике. Средний диаметр древостоя – 37 см, средняя высота – 31 м, бонитет – 1. Ярус подроста и подлеска имеет сомкнутость 0,3. Доминирующие позиции в ярусе занимают ель (*Picea abies L.*) и рябина (*Sorbus aucuparia L.*), участие других видов незначительно. Проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса составляет 60%; в нём преобладают вейник тростниковидный (*Calamagrostis arundinacea L.*), майник двулистный (*Maianthemum bifolium L.*) и кислица (*Oxalis acetosella L.*). Для травяного покрова характерно произрастание таких видов, как черника (*Vaccinium myrtillus L.*), брусника (*Vaccinium vitis-idaea L.*), ожика волосистая (*Luzula pilosa L.*), зеленчук жёлтый (*Galeobdolon luteum Hads*), сныть (*Aegopodium podagraria L.*), звездчатка ланцетолистная (*Stellaria holostea L.*). В моховом ярусе, проективное покрытие которого достигает 70%, доминируют зеленые мхи – плевроциум Шребера (*Pleurozium schreberi*) и гилокомиум блестящий (*Hylocomium splendens*).

Объектами изучения углекислотного газообмена ели служили интактные побеги нижней части крон модельных деревьев на высоте 2–2,5 м. При выборе объекта исследования основывались на том, что побег может служить моделью фотосинтезирующей кроны и отражает физиологическое состояние дерева.

Интенсивность нетто-фотосинтеза и светового дыхания определяли газометрическим методом, модифицированным применительно к объекту исследования (метод закрытых камер), с использованием специально сконструированного на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова комплекта оборудования. Длительность экспозиции на каждом побеге составляла 30–60 с [7].

Для расчета изменения массы углерода (в форме  $\text{CO}_2$ ) в камере за время экспозиции использовали выражение, основанное на уравнении Менделеева–Клайперона:

$$DC = (12 \cdot 10^{-6} \cdot DM \cdot P \cdot V) / (8,314 (t + 273)), \quad (1),$$

где  $DC$  – изменение массы углерода в камере, г С;  $12$  – молярная масса углерода, г С • моль<sup>-1</sup>;  $10^{-6}$  – пересчетный коэффициент из ppm в объёмные доли, ppm<sup>-1</sup>;  $DM$  – изменение концентрации  $\text{CO}_2$  в камере, ppm;  $P$  – атмосферное давление, Па;  $V$  – объем камеры, м<sup>3</sup>;  $8,314$  – универсальная газовая постоянная, Па • м<sup>3</sup> • °К<sup>-1</sup> • моль<sup>-1</sup>;  $t$  – температура воздуха, °С;  $273$  – параметр для пересчета температуры в °К.

Показатели интенсивности фотосинтеза и дыхания хвой ели приведены в мг  $\text{CO}_2$ /г сухой массы • ч, так как расчёт на сухую массу позволяет сравнивать величины ассимиляции и эмиссии  $\text{CO}_2$ , характеризующие эффективность воспроизводства и

разложения растениями органического вещества, что весьма важно для характеристики продуктивности фитоценозов.

Для выявления зависимости углекислотного газообмена от факторов внешней среды при каждом измерении определяли температуру воздуха окружающей среды и температуру воздуха в камере (показатели отличались между собой не более, чем на 1–2°С) и общую облачность.

В работе использовали значения фотосинтетически активной радиации (ФАР), рассчитанные согласно методике Д.В. Карелина и др. [8] как функция потенциальной суммарной солнечной радиации (при ясном небе) и облачности:

$$\text{ФАР} = I(-52,1C + 1439) \quad (2),$$

где  $\text{ФАР}$  – фотосинтетически активная радиация (мкЭ/м<sup>2</sup> • с);  $I$  – потенциальная суммарная солнечная радиация для метеостанции Валдай (кВт • м<sup>-2</sup>);  $C$  – облачность (0–10 баллов).

Математическую обработку данных проводили с использованием корреляционного и регрессионного методов анализа.

### Результаты и обсуждение

Сезонная динамика интенсивности фотосинтеза ели европейской (*Picea abies L.*) отражала воздействие комплекса внешних факторов и представляла собой данные, необходимые для оценки углекислотного газообмена хвой древостоя ели.

Интенсивность фотосинтетического газообмена находилась в прямой зависимости от температуры воздуха (рис. 1).

По нашим наблюдениям, в 2013 г. самым тёплым месяцем был июнь, самым холодным – сентябрь, соответственно максимальные значения сезонной интенсивности нетто-фотосинтеза у ели наблюдались в июне, минимальные – в сентябре. Интенсивность фотосинтеза в июне увеличилась по сравнению с маем в 2 раза и составила 9,4 мг  $\text{CO}_2$ /г сухой массы • ч. В дальнейшем наблюдалось снижение показателя фотосинтеза: в сентябре интенсивность ассимиляции  $\text{CO}_2$  уменьшилась по сравнению с июнем в 2,7 раза до 3,4 мг  $\text{CO}_2$ /г сухой массы • ч.

В 2014 г. наиболее теплыми месяцами являлись май и июль: температура воздуха составила чуть меньше 25°С. На эти месяцы приходятся максимумы интенсивности фотосинтеза – 8,3 и 8,4 мг  $\text{CO}_2$ /г сухой массы • ч, им на графике соответствуют два пика – “весенний” и “летний”. При этом в последней декаде июня наблюдалась прохладная погода, которая способствовала ослаблению процесса фотосинтеза по сравнению с маем в 1,4 раза. Сезонный минимум интенсивности фотосинтеза, в 2,3 раза ниже июльских значений, отмечался в сентябре при температуре воздуха, равной 11°С.

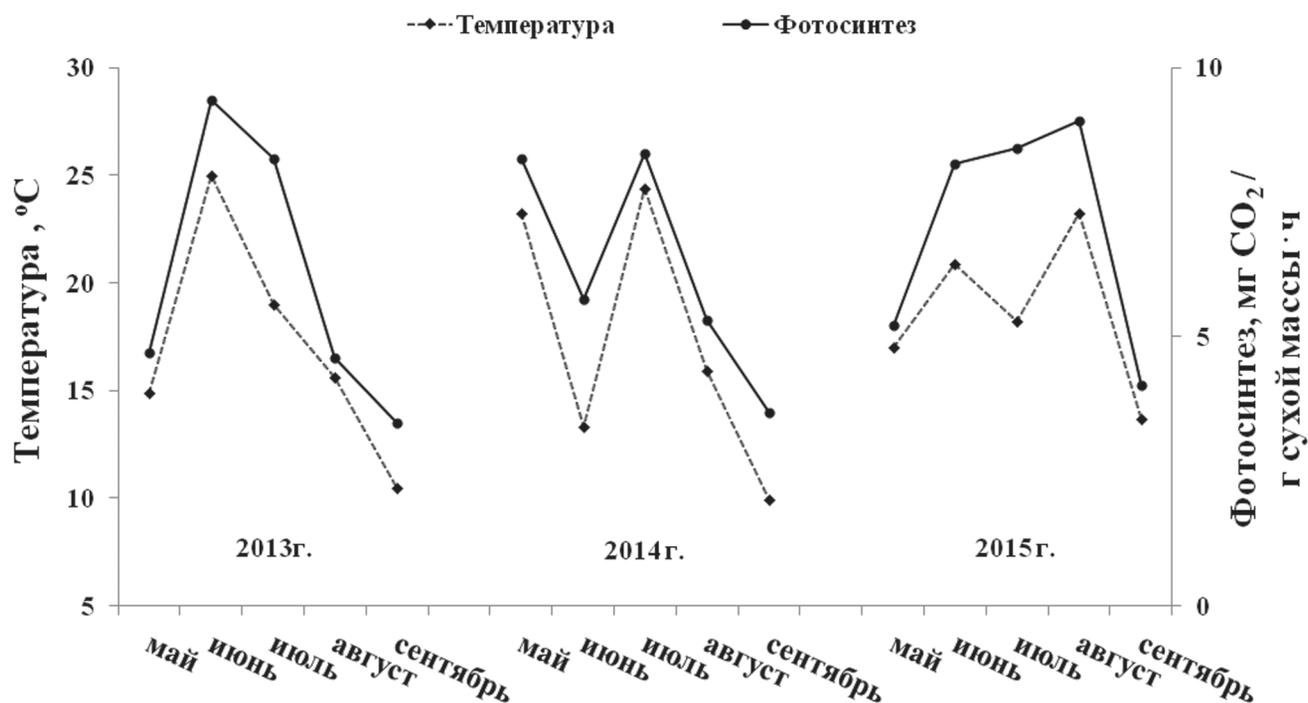


Рис. 1. Сезонная динамика интенсивности фотосинтеза хвой ели и температуры воздуха (средняя величина показателей за три дня измерений)

В 2015 г. максимальное значение интенсивности нетто-фотосинтеза у ели, равное  $9,0 \text{ мг CO}_2/\text{г сухой массы} \cdot \text{ч}$ , наблюдалось в августе, когда воздух прогрелся до  $23^\circ\text{C}$ . Понижение температуры воздуха в сентябре до  $14^\circ\text{C}$  привело к снижению интенсивности фотосинтеза в 2,2 раза по сравнению с предыдущим месяцем.

Корреляционный анализ связи интенсивности фотосинтеза хвой с температурой воздуха выявил прямую линейную зависимость между показателями (коэффициент корреляции  $R$  равен  $0,860$ ,  $p < 0,001$ ) (рис. 2, А).

Анализ полученных нами данных свидетельствует о том, что температура воздуха является одним из основных факторов, определяющих в природных условиях реализацию потенциальных возможностей фотосинтетического аппарата ели.

Другим существенным фактором, оказывающим влияние на интенсивность фотосинтеза, является освещённость. В работе исследовали зависимость процесса фотосинтеза от ФАР (рис. 3). Максимальные значения ФАР, равные  $600\text{--}640 \text{ мкЭ}/\text{м}^2 \cdot \text{с}$ , отмечены в мае–июле каждого сезона; минимальные, около  $300 \text{ мкЭ}/\text{м}^2 \cdot \text{с}$ , – в сентябре, что связано

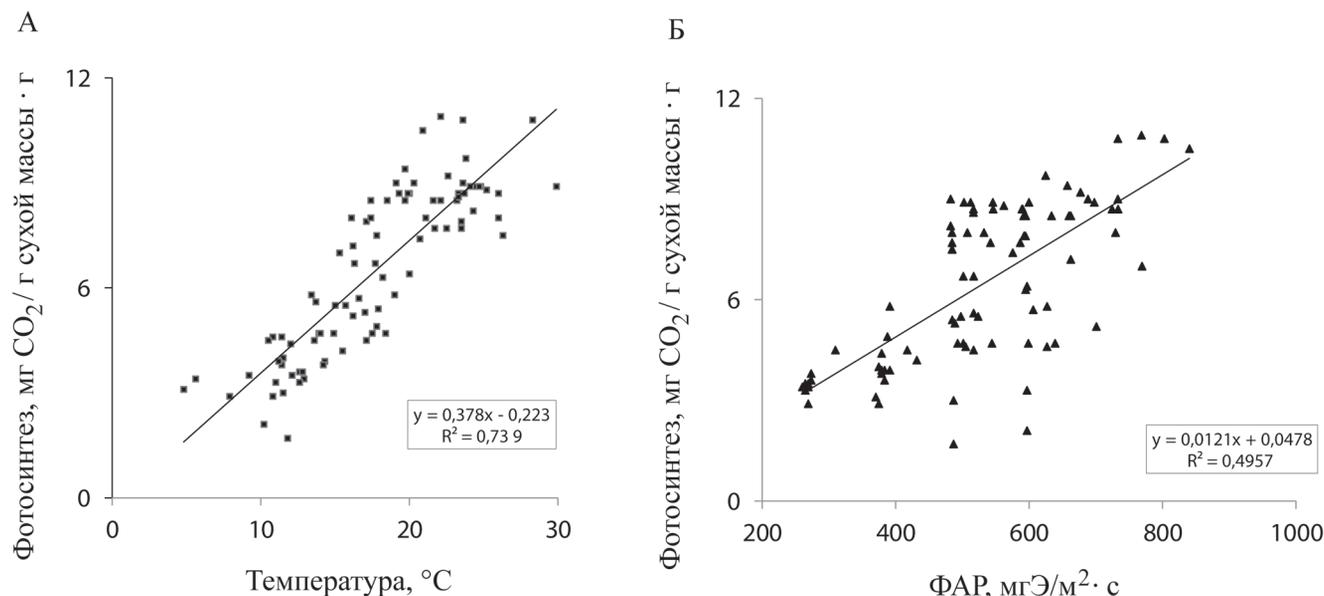


Рис. 2. Зависимость интенсивности ассимиляции  $\text{CO}_2$  у ели от факторов внешней среды: А – от температуры; Б – от освещённости (ФАР – фотосинтетически активная радиация)

с уменьшением потенциальной суммарной солнечной радиации в осенние месяцы. Согласно полученным результатам, интенсивность фотосинтеза хвои ели находилась в прямой зависимости от ФАР. Наблюдаемое изменение интенсивности фотосинтеза при постоянных значениях освещённости в период с мая по июль 2014 г., по-видимому, обусловлено доминирующим влиянием на процесс фотосинтеза температуры воздуха. Увеличение интенсивности фотосинтеза при уменьшении освещённости в июле 2015 г., очевидно, с учетом отсутствия прямой зависимости между фотосинтезом и температурой воздуха, можно объяснить превалированием влияния на процесс фотосинтеза других факторов среды, которые в данной работе не исследовались.

Следует отметить, что в классическом варианте зависимость фотосинтеза от света выражается световой кривой фотосинтеза, имеющей вид гиперболы, и, условно, её можно считать линейной лишь в диапазоне изменения освещённости 0–40 Вт/м<sup>2</sup>.

Однако прямая линейная зависимость интенсивности фотосинтеза от освещённости в исследуемом интервале ФАР была подтверждена в результате выполненного нами корреляционного анализа. Коэффициент корреляции  $R$ , равный 0,704 ( $p < 0,001$ ), свидетельствует о наличии высокой связи между показателями (рис. 2Б). Аналогичные результаты получены К.С. Бобковой и В.В. Тужилкиной [12]: линейный характер зависимости фотосинтеза от освещённости отмечен в диапазоне изменения освещённости 0–600 Вт/м<sup>2</sup>.

Для изучения множественной корреляционной зависимости интенсивности фотосинтеза от метеорологических условий в модель включили температуру воздуха и освещённость. Окончательные результаты представлены в уравнении множественной регрессии:

$$Y = -1,885 + 0,298 X_1 + 0,006 X_2, \quad (3),$$

где  $Y$  – интенсивность фотосинтеза, мг  $CO_2$ /г сухой массы • ч;  $X_1$  – температура воздуха, °С;  $X_2$  – ФАР, мкЭ/м<sup>2</sup> • с.

Регрессионный анализ показал, что исследуемые нами параметры оказывают самостоятельное воздействие на изменчивость показателя фотосинтеза. Все регрессионные коэффициенты оказались статистически значимыми (табличное значение  $t$ -критерия Стьюдента для 5%-ного уровня значимости составило 1,987).

Проверка нулевой гипотезы о статистической незначимости построенной модели с помощью  $F$ -критерия Фишера, равного 198,9, показала, что связь между результативным и факторными признаками существенна (табличное значение  $F$ -критерия Фишера для доверительной вероятности 0,95 равно 3,1).

Одним из показателей качества модели традиционно считается коэффициент множественной корреляции. В нашем случае он равен 0,906, что характеризует очень тесную связь между зависимой переменной и двумя факторами. При оценке степени совокупного влияния температуры и освещённости

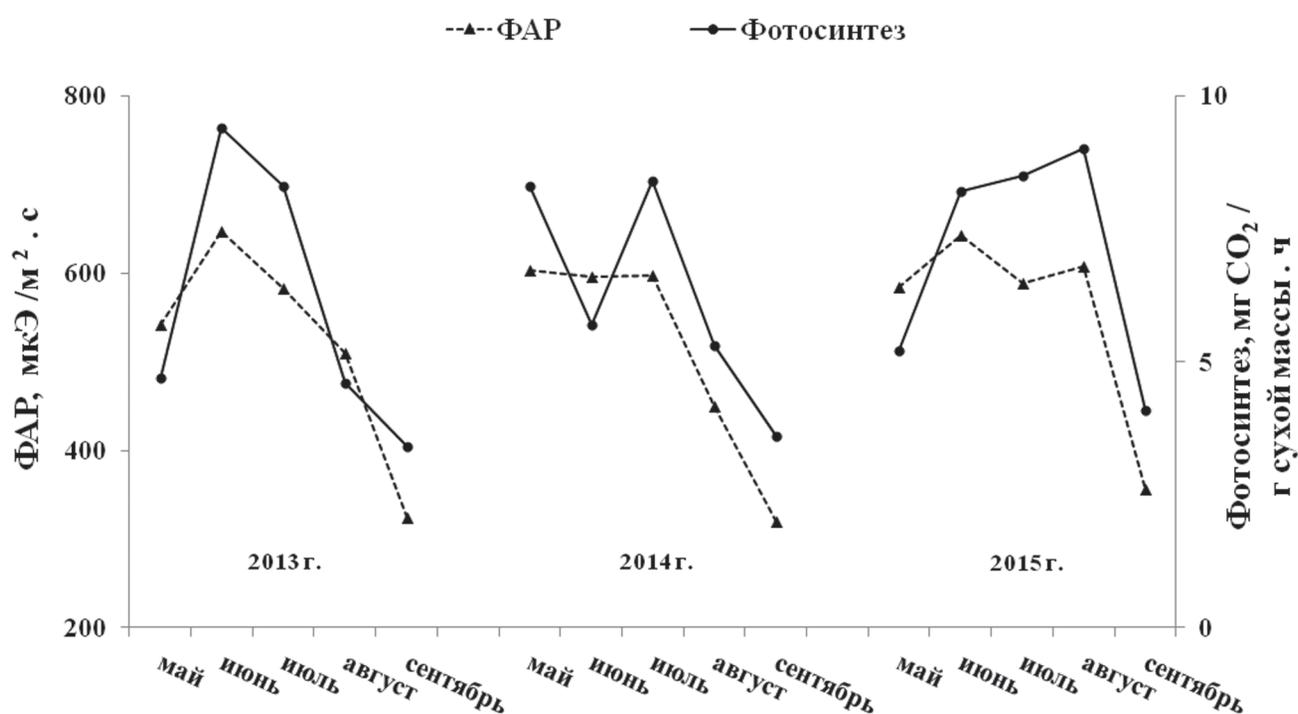


Рис. 3. Сезонная динамика интенсивности фотосинтеза хвои ели и освещённости (средняя величина показателей за три дня измерений)

щенности на интенсивность фотосинтеза хвои ели получили коэффициент детерминации  $R^2$ , равный 0,820. Таким образом, в совокупности вариация независимых переменных, включенных в модель, позволяет объяснить 82% вариации зависимой переменной. Очевидно, что остальную часть изменчивости вызывали факторы, не включенные нами в рассмотрение.

Анализ уравнения регрессии в стандартизованном виде показал, что наиболее сильное влияние на процесс фотосинтеза оказывает температура воздуха.

В ряде работ по изучению фотосинтеза ели констатируется факт влияния на него факторов внешней среды [9–11]. Линейный характер зависимости скорости дневного поглощения  $\text{CO}_2$  от солнечной радиации и температуры, а также практическое её отсутствие – от влажности воздуха и содержания  $\text{CO}_2$  в воздухе, для коренных еловых лесов Севера ранее был установлен в исследованиях К.С. Бобковой и В.В. Тужилкиной [12]. Максимальные скорости ассимиляции ели в условиях средней тайги отмечены в июле при наиболее благоприятном сочетании температурных и световых условий. Коэффициент корреляции между фотосинтетической активностью хвои и температурой воздуха в сезонной динамике равен 0,74.

Согласно данным А.С. Щербатюка и др. [13], зависимость фотосинтеза ели от температуры в течение вегетации имеет двухвершинный характер: отмечаются два пика, приуроченные к периодам невысокой температуры воздуха и оптимального почвенного увлажнения – в мае (поздняя весна) и июле (период дождей). Максимальная интенсивность фотосинтеза зарегистрирована в мае при температуре  $10^\circ\text{C}$ , при этом все температуры выше этого значения вызывали резкое снижение интенсивности фотосинтеза, обусловленное, по мнению авторов, адаптацией фотосинтетического аппарата в период вегетации к низкой температуре воздуха. Перегрев фотосинтетического аппарата древостоя в период исследований обусловил внутрисезонную депрессию фотосинтеза в июне.

В наших наблюдениях подобная закономерность не выявлена: как отмечено выше, интенсивность фотосинтеза хвои ели возрастала пропорционально повышению температуры до оптимальных значений, что согласуется с результатами, полученными рядом исследователей [14]. Как отмечают Г.Г. Суворова и др. [15], сезонный максимум фотосинтеза у ели в условиях Предбайкалья наблюдался в июле при температуре  $20\text{--}25^\circ\text{C}$ . В сентябре с понижением температуры интенсивность фотосинтеза снижалась.

Вероятно, это обусловлено чувствительностью к действию температуры реакции карбоксилирования. Ранее нами было установлено, что для проявления максимальной активности ключевых ферментов фотосинтетического углеродного метаболизма

(рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы) диапазон оптимальных температур составляет  $22\text{--}25^\circ\text{C}$ . [16]. В связи с этим в наших исследованиях сезонный максимум нетто-фотосинтеза у ели наблюдался в июне 2013 г., июле 2014 г. и августе 2015 г. при температуре  $25^\circ\text{C}$ ,  $24^\circ\text{C}$  и  $23^\circ\text{C}$ , соответственно; с понижением оптимума температуры отмечено уменьшение уровня интенсивности ассимиляции  $\text{CO}_2$ .

Одновременно с изменением интенсивности нетто-фотосинтеза в зависимости от температуры повышается или понижается уровень дыхания. Следует отметить, что средняя за период наблюдений величина дыхательного газообмена хвои ели варьировала в интервале от 1,6 мг  $\text{CO}_2/\text{г}$  сухой массы  $\cdot$  ч при температуре воздуха  $11^\circ\text{C}$  в сентябре до 3,1 мг  $\text{CO}_2/\text{г}$  сухой массы  $\cdot$  ч в июле, когда температура воздуха составила  $21^\circ\text{C}$  (рис. 4).

По нашим расчетам, среднее значение нетто-фотосинтеза за сезон в три раза превышало уровень светового дыхания, что свидетельствует о положительном углекислотном балансе хвои ели нижней части полога старовозрастного древостоя. Аналогичные данные получены и другими авторами [17].

Таким образом, в результате исследования воздействий внешних факторов среды – температуры воздуха и освещенности – на интенсивность фотосинтеза хвои нижней части полога ели европейской (*Picea abies* L.) на полигоне “Таёжный лог” в тёплый сезон 2013–2015 гг. установлена прямая линейная зависимость между показателями: коэффициенты корреляции составили 0,860 ( $p < 0,001$ ) и 0,704 ( $p < 0,001$ ), соответственно.

На основе разработанной модели множественной регрессии выявлено, что в совокупности вариация температуры и ФАР позволяет объяснить 82% вариации интенсивности фотосинтеза; при этом из двух факторов наиболее сильное влияние на процесс оказывает температура воздуха.

С нашей точки зрения, наблюдаемый максимум нетто-фотосинтеза при температуре, равной  $23\text{--}25^\circ\text{C}$ , а также уменьшение уровня интенсивности ассимиляции  $\text{CO}_2$  с понижением оптимума температуры обусловлены чувствительностью реакции карбоксилирования к действию температуры.

Положительный углекислотный газообмен хвои ели европейской (*Picea abies* L.) нижней части полога старовозрастного древостоя свидетельствуют о существенном вкладе фотосинтетического аппарата в углеродный баланс (сток углерода) южнотаёжного ельника.

Работа выполнена в рамках темы биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова № 01200117369 “Оценка состояния экосистем по данным экологического мониторинга” и при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-17-00123).

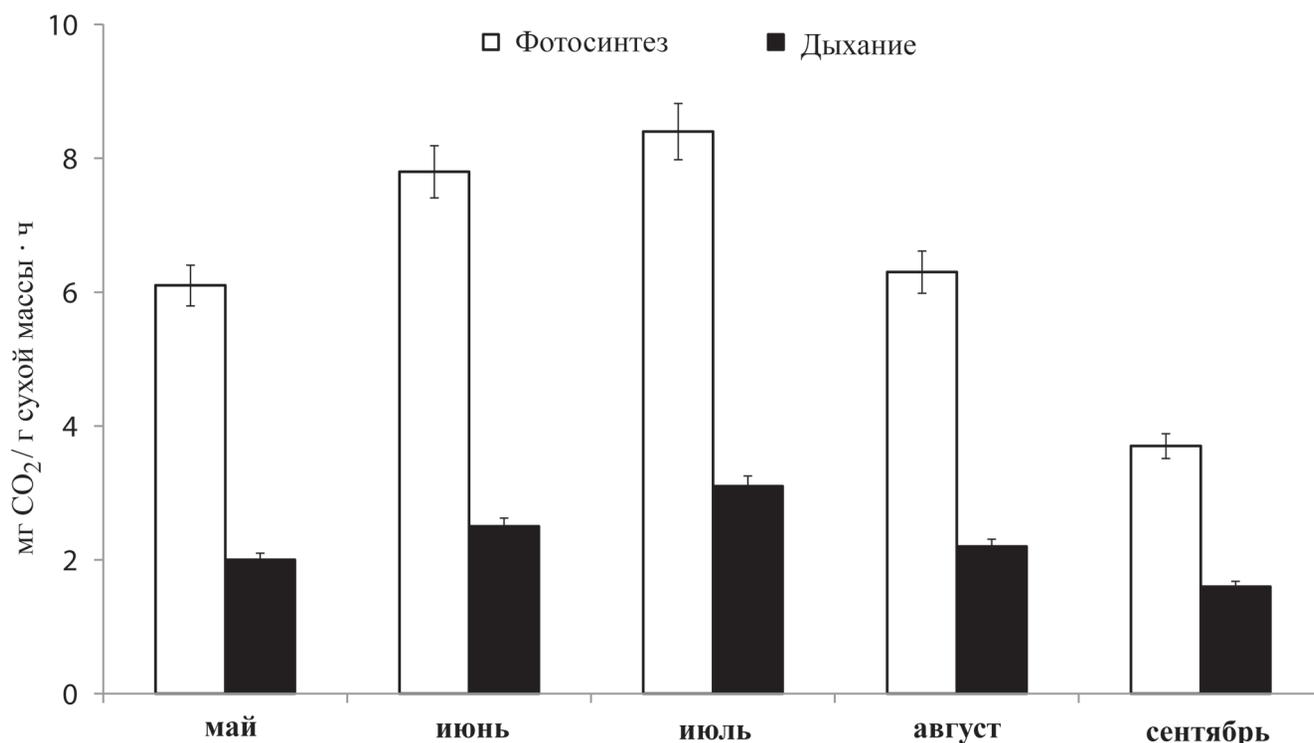


Рис. 4. Сезонные показатели фотосинтеза и дыхания хвои ели европейской (средняя величина показателей за три года измерений)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dixon R.K., Solomon A.M., Brown S., Houghton R.A., Trexler M.C., Wisniewski J. Carbon pools and flux of global forest ecosystems // *Science*. 1994. Vol. 263. N 5144. P. 185–190.
- Zamolodchikov D.G., Grabovskii V.I., Kraev G.N. A twenty year retrospective on the forest carbon dynamics in Russia // *Contemp. Probl. Ecol.* 2011. Vol. 4. N 7. P. 706–715.
- Goodale C.L., Apps M.J., Birdsey R.A., Field C.B., Heath L.S., Houghton R.A., Jenkins J.C., Kohlmaier G.H., Kurz W., Liu S., Nabuurs G.-J., Nilsson S., Shvidenko A.Z. Forests carbon sinks in the Northern Hemisphere // *Ecol. Appl.* 2002. Vol. 12. N 3. P. 891–899.
- Pan Y., Birdsey R.A., Fang J. et al. A large and persistent carbon sink in the world's forests // *Science*. 2011. Vol. 333. N 6045. P. 988–993.
- Field C.B., Kaduk J. The carbon balance of an old-growth forest: building across approaches // *Ecosystems*. 2004. Vol. 7. N 5. P. 525–533.
- Luyssaert S., Schulze E.-D., Börner A., Knohl A., Hessenmoller D., Law B.E., Ciais P., Grace J. Old-growth forests as global carbon sinks // *Nature*. 2008. Vol. 455. N 7210. P. 213–215.
- Yuzbekov A.K., Zamolodchikov D.G., Ivashchenko A.I. Spruce fir photosynthesis in the forest ecosystems of the log Tayezhnyi test area // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 169–172.
- Karelin D.V., Zamolodchikov D.G., Zukert N.V., Chestnykh O.V., Pochikalov A.V., Kraev G.N. Interannual changes in PAR and soil moisture during warm season may be more important than temperature fluctuations in directing annual carbon balance in Tundra // *Biol. Bull. Rev.* 2013. Vol. 3. N 5. P. 371–387.
- Gaumont-Guay D., Margolis H.A., Bigras F.J., Raulier F. Characterizing the frost sensitivity of black spruce photosynthesis during cold acclimation // *Tree Physiol.* 2003. Vol. 23. N 5. P. 301–311.
- Saunders M., Tobin B., Black K., Gioria M., Nieuwenhuis M., Osborne B.A. Thinning effects on the net ecosystem carbon exchange of a Sitka spruce forest are temperature-dependent // *Agr. Forest Meteorol.* 2012. Vol. 157. N 5. P. 1–10.
- Stinziano J.R., Hüner N.P.A., Way D.A. Warming delays autumn declines in photosynthetic capacity in a boreal conifer, Norway spruce (*Picea abies*) // *Tree Physiol.* 2015. Vol. 35. N 12. P. 1303–1313.
- Бобкова К.С., Тужилкина В.В. Углеродный цикл в еловых экосистемах // *Коренные еловые леса севера: биоразнообразие, структура, функции* / Под ред. К.С. Бобковой, Э.П. Галенко. СПб: Наука, 2006. С. 265–288.
- Щербатюк А.С., Русакова Л.В., Суворова Г.Г., Янькова Л.С. Углекислотный газообмен хвойных Предбайкалья. Новосибирск: Наука, 1991. 135 с.
- Way D.A., Sage R.F. Thermal acclimation of photosynthesis in black spruce [*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.] // *Plant Cell Environ.* 2008. Vol. 31. N 9. P. 1250–1262.
- Суворова Г.Г., Янькова Л.С., Копытова Л.Д., Филиппова А.К. Максимальная интенсивность фотосинтеза сосны обыкновенной и ели сибирской в Предбайкалье // *Сиб. экол. журн.* 2005. № 1. С. 97–108.
- Юзбеков А.К., Магомедов И.М. Влияние температуры на синтез карбоксилирующих ферментов в этиолированных листьях растений с C<sub>3</sub><sup>-</sup> и C<sub>4</sub><sup>-</sup> путем фотосинтеза на свету // *Фотосинтез, дыхание и органические кислоты* / Под ред. А.А. Землянухина, В.В. Полевого. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 1980. С. 37–42.
- Cannell M.G.R., Thornley J.H.M. Modelling the components of plant respiration: some guiding principles // *Ann. Bot.* 2000. Vol. 85. N 1. P.45–54.

Поступила в редакцию  
22.11.2016  
Принята к печати  
02.03.2017

## ECOLOGY

CARBON DIOXIDE EXCHANGE IN THE NEEDLES OF THE COMMON SPRUCE  
OF SOUTHERN TAIGA SPRUCE FORESTS*A.K. Yuzbekov\*, D.G. Zamolodchikov**Department of General Ecology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory, 1-12, Moscow, 119234, Russia**\*e-mail: uak2003@mail.ru*

The dynamics of carbon dioxide exchange in the common spruce (*Picea abies L.*) in relation to environmental factors was monitored for several seasons. A direct linear dependence of photosynthesis intensity on the levels of air temperature and illumination was established (the correlation coefficient was 0,860 ( $p < 0.001$ ) and 0,704 ( $p < 0.001$ )). It was revealed that the seasonal maximum of net photosynthesis production was attained at temperatures of 23–25°C. A decrease in temperature optimum was associated with a reduced level of CO<sub>2</sub> assimilation intensity. The impact of environmental factors on photosynthesis intensity was considered in terms of a model developed by us. Using the model, we demonstrated that the temperature and illumination dynamics *in toto* accounts for 82% of changes in photosynthesis intensity. It is the air temperature that exerts the strongest influence on the process of photosynthesis. According to our calculations, the net photosynthesis level was three times higher than the respiration level. This is indicative of a positive carbon dioxide balance in the needles of the common spruce.

**Key words:** *the seasonal dynamics, spruce fir, net photosynthesis, respiration, temperature, illumination*

**Сведения об авторах**

*Юзбеков Ахмед Кадималиевич* – докт. биол. наук, проф. кафедры общей экологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-52-54; e-mail: uak2003@mail.ru.

*Замолодчиков Дмитрий Геннадьевич* – докт. биол. наук, зав. кафедрой общей экологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-52-54; e-mail: dzamolod@mail.ru.