

Научно-теоретический и информационно-методический журнал
Белорусского республиканского фонда
фундаментальных исследований

Издается с III квартала 1997 г.



№ 1 [51], 2010

**ВЕСТНИК
ФОНДА
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ**

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Зарегистрирован
в Министерстве информации
Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации
№ 426 от 29.05.2009

Учредитель:
Белорусский
республиканский
фонд
фундаментальных
исследований

220072, г. Минск,
пр. Независимости, 66;
тел. 284-07-42,
284-25-05

Издатель:
РУП «Издательский дом
«Беларуская навука»

Главный редактор
В. А. Орлович

Заместители главного редактора
Е. М. Бабосов
В. И. Недилько

Ответственный секретарь
Н. Н. Костюкович

Члены редколлегии:

В. Ф. Багинский	М. И. Мушинский
Н. Н. Бамбалов	П. Г. Никитенко
А. В. Бильдюкевич	В. Н. Новиков
П. А. Витязь	В. П. Пархоменко
И. В. Гайшун	Б. А. Плотников
М. И. Демчук	В. И. Прокошин
А. К. Карабанов	В. И. Стражев
А. В. Кильчевский	Л. М. Томильчик
А. В. Кухарев	Ю. С. Харин
П. Д. Кухарчик	Л. В. Хотылева
А. И. Лесникович	И. И. Цыркун
А. А. Махнач	В. Н. Шимов
А. Г. Мрочек	

Минск, 2010

СОДЕРЖАНИЕ

ДЕНЬ БЕЛОРУССКОЙ НАУКИ

Поздравление Президента Республики Беларусь с Днем белорусской науки.....	5
---	---

НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Серченя Т. С., Свиридов О. В. Особенности микроокружения остатков триптофана в третичной структуре альфа-1-микроглобулина человека	6
Докукова Н. А., Кафтайкина Е. Н., Конон П. Н. Сравнительный анализ трех методов расчета многоэлементных механических колебательных систем	15
Алексеев Г. Д., Батурицкий М. А., Давыдов Ю. И., Дворников О. В., Пискун А. А., Терлецкий А. В., Токменин В. В., Чеховский В. А., Шульгевич Ю. Ф. Полузаказная интегральная микросхема трансимпедансного усилителя-дискриминатора для газоразрядных детекторов	24
Чижик О. В., Малюш М. К. Цитоморфологическая и биохимическая характеристика растений, произрастающих на территориях с повышенной радиоэкологической нагрузкой	35
Башилов А. В. Влияние липоперекисей на антиокислительные свойства флавоноидсодержащих экстрактов	46
Коваленко В. В., Ломакова О. О., Ерчак Н. П. Рострегулирующая активность гидрооксалатов метилбис(фенилметил)- γ -аминопропилсиланов	52
Потапович М. В., Рубинов Д. Б., Еремин А. Н. Влияние гербицидов тралкоксидима и сектоксидима на глюкозооксидазу <i>Aspergillus Niger</i> при окислении глюкозы в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола и гексациано-(III)феррата калия	60
Пивень Н. В., Орлова Е. Е., Лухверчик Л. Н. Иммуноферментный анализ аутоантител к декарбоксилазе глутаминовой кислоты — маркера сахарного диабета I типа	70
Козел Н. В., Доманский В. П., Шалыго Н. В. Активность фотосинтетического аппарата и состояние антиоксидантной системы растений табака с повышенной экспрессией аскорбатпероксидазы при фотоокислительном стрессе	78

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СВЯЗИ

Протокол по результатам переговоров Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Вьетнамской академии наук и технологий	88
БРФФИ — DFG	89

ИТОГИ КОНКУРСОВ

Конкурс совместных проектов фундаментальных исследований БРФФИ и Вьетнамской академии наук и технологий «БРФФИ–ВАНТ-2010»	92
---	----

The scientific-theoretical and information-methodical journal
of the Belarusian Republican Foundation
for Fundamental Research

Issued since the 3rd quarter of 1997



N 1 [51], 2010

Registered in
The Ministry of Information
of the Republic of Belarus,
Certificate
№ 426 of May 29, 2009

The founder:
The Belarusian
Republican
Foundation
for Fundamental
Research

220072, Minsk,
Independence Av., 66;
ph. 284-07-42,
284-25-05

The publisher:
RUE «Publishing House
«Belaruskaya navuka»

**VESTNIK
OF THE FOUNDATION
FOR FUNDAMENTAL
RESEARCH**

EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief
V. A. Orlovich

Deputy Editors-in-Chief
E. M. Babosov
V. I. Nediľ'ko

Executive Secretary
N. N. Kostyukovich

Editorial board members:

V. F. Baginsky	A. G. Mrochek
N. N. Bambalov	M. I. Mushinsky
A. V. Bilydukevich	P. G. Nikitenko
I. V. Gaishun	V. N. Novikov
M. I. Demchuk	V. P. Parkhomenko
A. K. Karabanov	B. A. Plotnikov
Yu. S. Kharin	V. I. Prokoshin
L. V. Khotylyova	V. N. Shimov
A. V. Kilchevsky	V. I. Strazhev
P. D. Kukharchik	L. M. Tomilchik
A. V. Kukharev	I. I. Tsyrukun
A. I. Lesnikovich	P. A. Vityaz
A. A. Makhnach	

Minsk, 2010

CONTENTS

THE DAY OF BELARUSIAN SCIENCE

Congratulations by the President of the Republic of Belarus on the Day of Belarusian Science.....	5
---	---

SCIENTIFIC PUBLICATIONS

Serchenya T. S., Sviridov O. V. The peculiarities of tryptophan residues microenvironment in the tertiary structure of human alpha-1-microglobulin	6
Dokukova N. A., Konon P. N., Kaftaikina E. N. Comparative analysis of three calculation methods of the multibody mechanical vibration systems.....	15
Alexeev G. D., Baturitsky M. A., Davydov Yu. I., Dvornikov O. V., Piskun A. A., Terletskiy A. V., Tokmenin V. V., Tchekhovskiy V. A., Shulhevich Yu. F. The semicustom integrated transimpedance amplifier — discriminator microcircuit for gas-discharge detectors	24
Chyzhyk V. O., Maljush M. K. Cytomorphological and biochemical characteristics of plants, growing on the higher level of radioecological pressure territories.....	35
Bashilov A. V. Influence of lipoperoxids on antioxidizing properties of flavonoid-containing extracts.....	46
Kavalenka V. V., Lamakova V. A., Erchak N. P. Growth regulating activity of hydrooxalates of methylbis(phenylmethyl)- γ -aminopropylsilanes.....	52
Potapovich M. V., Rubinov D. B., Eryomin A. N. Effect of the herbicides tralkoxydim and sethoxydim on the glucose oxidase <i>Aspergillus Niger</i> oxidation of glucose in the presence of 2,6-dichloroindophenol and potassium ferricyanide.....	60
Piven N. V., Orlova E. E., Luchverchyk L. N. Immunoenzyme assay of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase — a marker of diabetes mellitus.....	70
Kozel N. V., Domanskii V. P., Shalygo N. V. Photosynthetic apparatus activity and antioxidant system condition in tobacco plants with overexpression of ascorbate peroxidase under photooxidative stress.....	78

INTERNATIONAL RELATIONS

Protocol on the results of negotiations of the Vietnamese Academy of Science and Technology and the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research	88
BRFFR—DFG	89

COMPETITIONS RESULTS

Joint competition of fundamental research projects «BRFFR—VAST-2010» of the BRFFR and the Vietnamese Academy of Science and Technology.....	92
---	----

ДЕНЬ БЕЛОРУССКОЙ НАУКИ

30.01.2010

ПОЗДРАВЛЕНИЕ ДЕЯТЕЛЯМ НАУКИ, РАБОТНИКАМ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ИНСТИТУТОВ И ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ

Уважаемые друзья!

Сердечно поздравляю вас с Днем белорусской науки.

Огромный интеллектуальный потенциал Беларуси является предметом нашей законной гордости. Плодотворная работа и высокая квалификация отечественных ученых получили широкое признание во всем мире.

В настоящее время вклад науки в развитие страны имеет исключительное значение. С помощью современных научных достижений наша страна сможет выйти на принципиально новый уровень решения стоящих перед обществом масштабных задач.

Белорусские научные коллективы должны привнести в экономику новаторские идеи и эффективные разработки, ведущие к повышению качества жизни народа.

Уверен, что постоянный творческий поиск и неиссякаемая энергия ученых позволят обеспечить достижение выдающихся научных результатов во имя процветания любимой Родины.

Желаю вам, дорогие друзья, крепкого здоровья, семейного благополучия, великих свершений и открытий, успехов и счастья.

**Президент Республики Беларусь
Александр Лукашенко**

НАУЧНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

УДК 577.322.5:577.112

Т. С. СЕРЧЕНЯ, О. В. СВИРИДОВ

ОСОБЕННОСТИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОСТАТКОВ ТРИПТОФАНА В ТРЕТИЧНОЙ СТРУКТУРЕ АЛЬФА-1-МИКРОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 22.09.2009)

В результате анализа пространственной структуры белка семейства липокалинов альфа-1-микроглобулина (А1М) человека впервые охарактеризованы микроокружение триптофанилов и степень их доступности молекулам растворителя. На основании компьютерного моделирования пространственной структуры А1М и данных по тушению его флуоресценции акриламидом и йодид-ионами сделан вывод о том, что триптофановые остатки в молекуле исследуемого белка в значительной степени экранированы. Обнаружена быстрая конформационная подвижность А1М, обусловленная флуктуациями структуры белка в наносекундном временном интервале.

Введение. Альфа-1-микроглобулин (А1М) человека — это гликопротеин с молекулярной массой около 30 кДа, который присутствует в плазме крови и некоторых тканях организма человека; при определенных почечных патологиях в достаточно высоких концентрациях появляется в моче [1–3]. Из этого источника он и был впервые выделен в 1975 г. традиционными методами белковой химии [4]. В настоящее время А1М получают в количествах, достаточных для структурно-функциональных исследований, благодаря применению иммуноаффинной хроматографии на иммобилизованных моноклональных антителах [5; 6]. Физиологическая функция этого белка в организме пока не определена. Известно, что А1М характеризуется иммуносупрессорными свойствами [7]. Описана также редуктазная активность А1М, которую он проявляет в процессах деградации гема [8; 9] и в восстановлении органических радикалов [10]. В плазме крови более 50 % А1М находится в составе ковалентных комплексов с другими белками (иммуноглобулином А, альбумином и протромбином) [11]. Физиологическая роль такого конъюгирования пока остается неясной.

Важно отметить, что А1М принадлежит к суперсемейству липокалинов, которые характеризуются способностью связывать и транспортировать низкомолекулярные гидрофобные соединения [12; 13]. Наиболее изученными из липокалинов, число которых к настоящему времени приблизилось к трем десяткам, являются ретинолсвязывающий белок, альфа-1-кислый гликопротеин (орозомукоид), простагландин-Д-синтетаза, аполипопротеин Д и одорантсвязывающий белок [12; 14]. **Пространственная структура липокалинов**, ответственная за потенциальную лигандсвязывающую функцию, является в высокой степени консервативной и общей для всех белков данного семейства. Каркас их структуры состоит из 8 антипараллельных β -тяжей, сложенных таким образом, что общая топология белковой глобулы напоминает цилиндр, внутренняя полость которого представляет собой лигандсвязывающий участок, или так называемый липокалиновый карман [12; 13]. Третичная структура А1М до сих пор не установлена, видимо, из-за сложностей методического или технического характера, которые могли возникнуть при кристаллографическом исследовании А1М. В связи с этим нужно отметить, что одним из наиболее информативных современных методов изучения особенностей конформации и внутримолекулярной подвижности белков является электронная спектроскопия в комбинации с компьютерным моделированием [15—18]. Так, в работе [19] проведен люминесцентный анализ пространственной структуры А1М. Исследование триптофановой флуоресценции данного липокалина в растворах мочевины и гуанидингидрохлорида показало, что разворачивание А1М под действием этих денатурирующих агентов сопряжено с выраженным усилением наносекундной внутримолекулярной динамики белка, причем все структурные превращения А1М полностью обратимы [19].

Цель работы — определить базовые характеристики пространственной структуры А1М, проанализировать микроокружение и особенности локализации триптофановых остатков методами тушения собственной флуоресценции белка акриламидом и ионами йода, а также путем компьютерного моделирования.

Материалы и методы исследования. В работе использовали KCl, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ («Белреакхим», Беларусь), KI, акриламид и гуанидингидрохлорид («Sigma», США). А1М получали иммуноаффинной хроматографией мочи человека на сорбенте с иммобилизованным моноклональным антителом к А1М, элюируя чистый белок при pH 2,3 [6].

Электронная спектроскопия А1М. Флуоресцентные и абсорбционные измерения выполняли на приборе SM 2203 («Solar», Беларусь) в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 1 см при 20 °С. Представленные результаты являются средними значениями пяти независимых опытов.

В экспериментах по тушению триптофановой флуоресценции йодид-ионами и акриламидом растворы с концентрацией белка 0,3 г/л и различными концентрациями тушителя (0—2,5 М) в 0,05 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 инкубировали в течение 1 ч при 20 °С, после чего определяли параметры флуоресценции. Измерения проводили при длине волны возбуждения 297 нм в диапазоне 310—450 нм. В опытах по тушению триптофановой флуоресценции йодидом использовали KCl для поддержания постоянного значения ионной

силы при изменении концентрации йодида в растворе, а также 10 мМ Na₂S₂O₃ для поддержания йодида в восстановленном состоянии, поскольку в противном случае возможно образование реакционноспособного I₂, который может проникать в неполярные области белка.

Оценку констант тушения йодидом и акриламидом проводили с использованием уравнения Штерна–Фольмера [15]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} \cdot [Q], \quad (1)$$

где F_0 и F — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно; K_q — бимолекулярная константа скорости процесса столкновения флуоресцирующих молекул в возбужденном состоянии и молекул тушителя; τ_0 — среднее квадратичное время жизни флуорофора в отсутствие тушителя (в расчетах использовалось значение τ_0 , равное 10^{-8} с [15; 16]); $[Q]$ — концентрация тушителя; K_{sv} — константа динамического тушения Штерна–Фольмера. Значение K_{sv} определяли графически по наклону линейного участка кривой зависимости F_0/F от $[Q]$.

Степень доступности флуорофоров А1М для тушителя анализировали, используя модифицированную форму уравнения Штерна–Фольмера [15; 16], принимая, что существуют два типа остатков триптофана, один из которых доступен для тушения, а другой недоступен, или «спрятан»:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_1 K_{sv} [Q]} + \frac{1}{f_1}, \quad (2)$$

где f_1 — доля начальной флуоресценции, доступная для тушения. Значение f_1 определяли графически ($F_0/(F_0 - F)$ — ось ординат, $1/[Q]$ — ось абсцисс) как отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат.

Спектры кругового дихроизма (КД) А1М записывали на спектрополяриметре J-20 («Jasco», Япония) в термостатируемой кювете с длиной оптического пути 0,1 см при концентрации белка 0,5–0,7 г/л. Скорость сканирования составляла 5 нм/мин при постоянной времени 16 с. Каждый спектр представлял собой усредненный результат 3–5 сканирований. Молярная эллиптичность была рассчитана, исходя из усредненной молекулярной массы аминокислотного остатка, равной 113. Компьютерную обработку спектров КД А1М осуществляли с помощью программы **CD Spectra Deconvolution Program (University of Halle-Wittenberg, Halle, Germany), Version 2.1** [20].

Компьютерная модель третичной структуры А1М. Компьютерная модель трехмерной структуры А1М была построена с помощью интернет-сервера Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>) [17] и программы MolSoft ICM 3.5 (<http://www.molsoft.com>) [18; 21]. В качестве шаблона использовали кристаллическую структуру липокалина простагландин-Д-синтазы (банк данных белков PDB: 2czu), который имеет в среднем 27 % гомологии аминокислотной последовательности с моделируемым белком.

Результаты и их обсуждение. Спектральные характеристики А1М были получены методами спектроскопии КД и флуоресценции. Как видно на рис. 1, а,

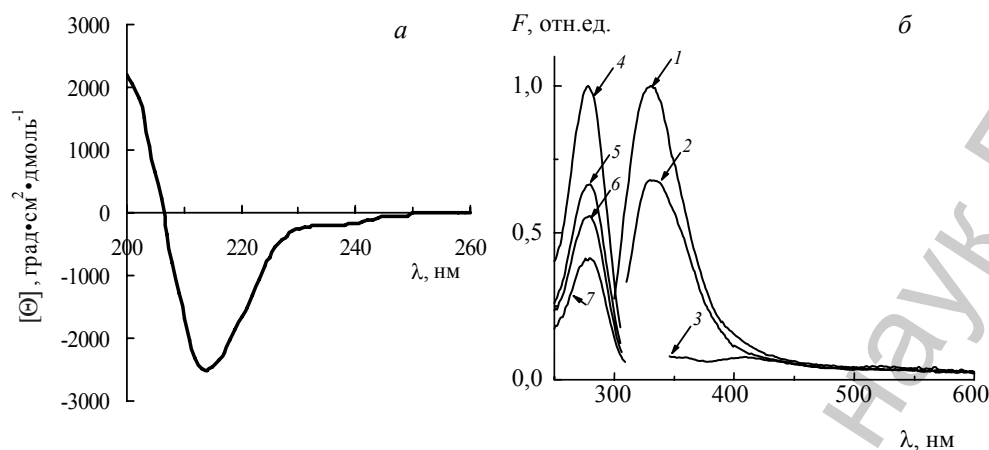


Рис. 1. Спектр КД (а), спектры испускания (1–3) и возбуждения (4–7) флуоресценции (б) А1М. 1 – $\lambda_{\text{возб. фл.}} = 280$ нм, 2 – $\lambda_{\text{возб. фл.}} = 297$ нм, 3 – $\lambda_{\text{возб. фл.}} = 320$ нм, 4 – $\lambda_{\text{рег. фл.}} = 332$ нм, 5 – $\lambda_{\text{рег. фл.}} = 340$ нм, 6 – $\lambda_{\text{рег. фл.}} = 350$ нм, 7 – $\lambda_{\text{рег. фл.}} = 360$ нм

спектр КД белка в ультрафиолетовой области (200–260 нм) при физиологическом значении рН 7,4 имеет один максимум оптической активности при 213–214 нм и характеризуется небольшими абсолютными величинами молярной эллиптичности (в пересчете на аминокислотный остаток). Спектры флуоресценции А1М представлены на рис. 1, б. Спектр испускания флуоресценции А1М при возбуждении светом 280 и 297 нм характеризуется максимумом при 332 нм. При возбуждении вне полосы поглощения триптофана ($\lambda_{\text{возб. фл.}} = 320$ нм) препарат белка практически не флуоресцирует (рис. 1, б, кривые 1–3).

Для определения локализации триптофановых остатков А1М использовали компьютерное моделирование третичной структуры белка и флуоресцентную спектроскопию. Компьютерная модель трехмерной структуры А1М была построена с помощью программы MolSoft ICM 3.5 [18; 21]. В качестве шаблона использовали кристаллическую структуру липокалина простагландин-Д-синтетазы (банк данных белков PDB: 2czu), который имеет наиболее схожую (27 % гомологии) аминокислотную последовательность с моделируемым белком.

Построенная модель третичной структуры А1М представлена на рис. 2, где указана локализация триптофановых остатков, изображены

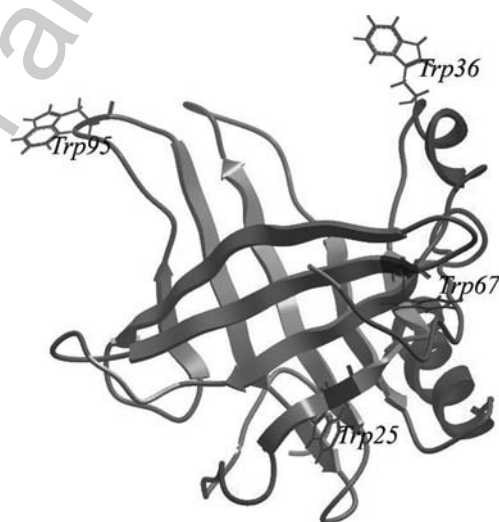


Рис. 2. Модель пространственной структуры А1М человека

β -структурные участки в виде стрелок и показана α -спираль молекулы. Модель иллюстрирует типичную для белков семейства липокалинов пространственную структуру из 8 антипараллельных β -тяжей, сложенных вокруг гидрофобного кармана. Консервативный триптофановый остаток в положении 25 локализован на дне липокалинового кармана, триптофаны в положениях 36, 67 и 95 расположены у входа в гидрофобную полость. Такое положение триптофанилов в молекуле А1М позволяет использовать метод тушения флуоресценции для исследования лигандсвязывающих свойств этого белка. Флуоресцентная спектроскопия успешно применялась для изучения связывающих свойств многих липокалинов [22–25].

С целью получения информации о доступности триптофановых остатков А1М растворителю проводили эксперименты по тушению триптофановой флуоресценции йодид-ионами и акриламидом. На рис. 3, *a* представлены кривые тушения флуоресценции А1М в координатах Штерна–Фольмера. Обнаружено, что при добавлении акриламида или КИ к растворам исследуемого белка происходит тушение его триптофановой флуоресценции на 97 и 28 % соответственно. Кроме того, в результате тушения йодидом наблюдался сдвиг спектров испускания нативного белка в коротковолновую область. Линейный график тушения флуоресценции акриламидом указывает на динамический характер процесса. Как видно на рис. 3, *a* (кривая 2), тушение флуоресценции триптофана йодидом в отсутствие денатуранта характеризуется изгибом и приближением графика Штерна–Фольмера к оси абсцисс. При высоких концентрациях тушителя доступные остатки триптофана потушены. Остаточная флуоресценция связана с недоступными для тушения триптофанилами, по-

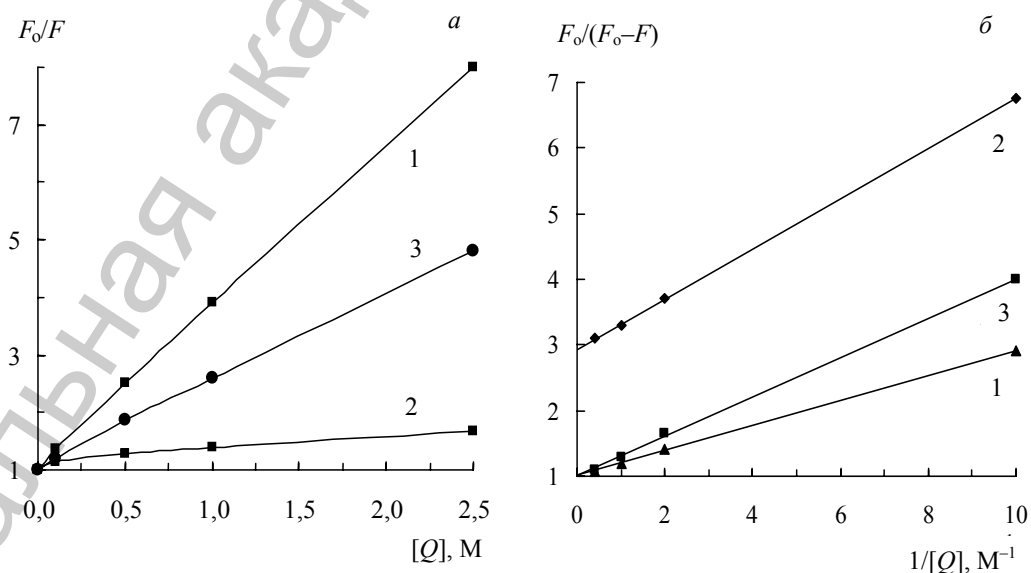


Рис. 3. Графики Штерна–Фольмера (*a*) и модифицированного уравнения Штерна–Фольмера (*б*) для тушения флуоресценции А1М акриламидом (1) и йодид-ионом (2, 3) в отсутствие (2) и присутствии (3) 6 М гуанидингидрохлорида

скольку их флуоресценция не зависит от концентрации тушителя. Оценку констант тушения проводили с использованием уравнения (1). Рассчитанные константы бимолекулярного тушения (K_q) для йодида и акриламида составили $0,22 \cdot 10^8$ и $2,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно.

Степень доступности флуорофоров белка для тушителя анализировали, используя модифицированную форму уравнения (2), принимая, что существуют два типа остатков триптофана, один из которых доступен для тушения, а другой — недоступен, или «спрятан». Разделить остатки триптофана на внутренние и внешние позволяет тушение А1М йодид-ионами в отсутствие и в присутствии 6 М гуанидингидрохлорида. Модифицированная форма уравнения (2) дает возможность установить графически долю доступной для тушения начальной флуоресценции белка. При тушении Г отсекаемый отрезок на оси ординат соответствует доступности только 30 % флуоресцирующих остатков (рис. 3, б, кривая 2). В противоположность состоянию в нативных условиях, в присутствии 6 М гуанидингидрохлорида все триптофановые остатки становятся доступными для этого тушителя (рис. 3, б, кривая 2). Для взаимодействия акриламида с нативным А1М, как и в случае системы, включающей Г и развернутый белок, отсекаемый отрезок на оси ординат равен 1 (рис. 3, б, кривая 1).

Особенностью белковых молекул является то, что каждый белок имеет свою уникальную нативную конформацию, т. е. пространственную укладку полипептидной цепи, благодаря которой способен выполнять ту или иную биологическую функцию. Знание пространственной структуры может объяснить некоторые свойства и функциональные возможности белковой молекулы. Достижения в структурном анализе способствуют развитию исследований, выявляющих взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и пространственной структурой белковых молекул, что позволяет понять механизмы складывания белка в компактную глобулу (фолдинга). Такие исследования представляют интерес не только с научной точки зрения, но и имеют практическое значение, так как понимание взаимосвязи между структурой и свойствами белка позволяет осуществлять его направленную модификацию и придавать ему новые функции, что является важным для биотехнологии и медицины.

В результате нашей работы определены некоторые характеристики вторичной и третичной структур А1М. По данным спектроскопии КД в ультрафиолетовой области (200—260 нм), вторичная структура А1М является преимущественно β -складчатой. Об этом свидетельствуют положение максимума оптической активности при 213—214 нм и небольшие абсолютные величины молярной эллиптичности (в пересчете на аминокислотный остаток), не характерные для α -спиралей (рис. 1, а). Деконволюционный анализ спектра КД позволил определить относительное содержание элементов вторичной структуры А1М: α -спираль — 11 %, антипараллельная β -структура — 35 %, параллельная β -структура — 5,5 %, β -изгибы — 19,5 %, беспорядочный клубок — 29 %. Полученные результаты согласуются с данными недавно опубликованной работы, посвященной рекомбинантному А1М [26].

По данным триптофановой флуоресценции, белок имеет компактную третичную структуру, о чем свидетельствует максимум при 332 нм. Спектральный

анализ А1М показал, что спектры возбуждения ультрафиолетовой флуоресценции А1М в интервале 250—305 нм по форме и положению максимума при 280 нм близки к спектру поглощения триптофана (рис. 1, б, кривые 4—7), а спектры испускания А1М по форме и положению максимумов соответствуют собственной флуоресценции триптофансодержащих белков (рис. 1, б, кривые 1—3) [15; 16; 27; 28]. Можно поэтому утверждать, что основной вклад в полосу ультрафиолетовой флуоресценции А1М с максимумами при 332 нм вносят триптофанилы. Согласно литературным данным [1], аминокислотная последовательность А1М человека включает четыре триптофанила в положениях 25, 36, 67 и 95. Данный факт важен с методической точки зрения для применения и интерпретации полученных результатов спектрофлуориметрии при изучении конформационных перестроек А1М. Интересной особенностью первичной структуры А1М является наличие консервативного, характерного для всех белков семейства липокалинов, триптофана в положении 25, который локализован внутри липокалинового кармана. Триптофановые остатки в положениях 36, 67, 95 находятся у входа в гидрофобную полость (рис. 2). Коротковолновое положение $\lambda_{\text{макс. фл.}}$ А1М (332 нм) свидетельствует о том, что триптофанилы находятся преимущественно в гидрофобном микроокружении и в существенной степени скрыты от водного окружения.

Более полное представление об экспонировании растворителю триптофановых остатков А1М мы получили по результатам тушения триптофановой флуоресценции белка внешними тушителями (акриламидом и KI). Выявлена различная доступность триптофанилов для указанных тушителей: максимальное тушение флуоресценции А1М в присутствии акриламида и KI составило 97 и 28 % соответственно, об этом же свидетельствует сравнение спектральных эффектов, вызванных эквивалентными концентрациями I⁻ и акриламида (рис. 3). Кроме того, в результате тушения йодидом наблюдался сдвиг спектров испускания нативного белка в коротковолновую область. Смещение положения максимума эмиссии объясняется тем, что остаточная флуоресценция исходит от внутренних, недоступных для тушителя триптофановых остатков.

Линейный график тушения флуоресценции акриламидом и константа бимолекулярного тушения, равная $2,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, указывают на динамический характер процесса тушения флуоресценции, который определяется частотой столкновений между флуорофором и тушителем. Поскольку аминокислотные остатки плотно упакованы, можно предположить, что внутри молекулы белка нет свободного пространства для молекулы, подобной акриламиду. Однако факт тушения акриламидом флуоресценции остатков триптофана исследуемого белка указывает на то, что этот тушитель все же диффундирует через белковую глобулу. Такую диффузию можно объяснить флуктуацией белковой матрицы в наносекундном временном диапазоне.

Слабое тушение йодидом, а также отклонение экспериментальной кривой Штерна—Фольмера от линейного вида (рис. 3) можно интерпретировать как результат неспособности I⁻ проникать во внутренние области белка. Известно, что сближению флуорофора и тушителя могут препятствовать как стерические факторы, так и заряд. Локальный заряд может увеличивать или умень-

шать концентрацию тушителя в окружающем пространстве, в результате чего скорость тушения флуоресценции будет значительно ниже, чем можно ожидать для диффузионно-контролируемой реакции, что подтверждает полученная для йодида K_q , равная $2,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В противоположность йодид-ионам нейтральные тушители, подобные акриlamиду, не чувствительны к заряду микроокружения флуорофора. Тушение йодид-ионами или другими соединениями, не проникающими в белки, может быть использовано для определения той части общей интенсивности флуоресценции, которая обусловлена остатками, локализованными на поверхности. Разделить остатки триптофана на внутренние и внешние позволяет тушение А1М йодид-ионами в отсутствие и в присутствии денатурирующих агентов, которые вызывают нарушение нативной структуры вследствие разворачивания белковой глобулы.

При использовании различных внешних тушителей остаточная флуоресценция связана с не доступными для тушения триптофанилами, поскольку их эмиссия не зависит от концентрации тушителя (рис. 3, кривая 2). Модифицированная форма уравнения (2) позволяет установить долю доступной для тушения начальной флуоресценции А1М. Согласно полученным экспериментальным данным, доступными для тушения йодидом являются только 30 % флуоресцирующих остатков. Этот результат указывает на то, что, по крайней мере, два из четырех остатков находятся внутри белка, в области, не проникаемой для Γ . В случае системы, включающей Γ и развернутый белок, все остатки триптофана становятся доступными для тушителя. Показано также, что все триптофаны одинаково доступны для тушения акриlamидом. Принимая, что, по крайней мере, один остаток находится внутри белка, можно полагать, что третичная структура А1М проницаема для акриlamиды.

Таким образом, используя методы флуоресцентной спектроскопии и компьютерного моделирования, впервые охарактеризовано микроокружение остатков триптофана А1М человека. Анализируя данные, касающиеся спектров собственной флуоресценции А1М, тушения его триптофановой флуоресценции и результатов компьютерного моделирования, можно сделать вывод о том, что остатки триптофана в молекуле белка в значительной степени экранированы. В то же время триптофаны являются доступными для акриlamиды, внешнего тушителя флуоресценции, что свидетельствует о диффузии тушителя сквозь белковую матрицу благодаря ее флуктуациям, т. е. о наличии быстрой внутримолекулярной динамики белка в наносекундном временном диапазоне.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, проект № Б07М-142.

Литература

1. Akerstrom B. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1482, N 1—2. P. 172—84.
2. Penders J., Delanghe J. R. // Clin. Chim. Acta. 2004. Vol. 346, N 2. P. 107—118.
3. Andersson L. et al. // Nephrol. Dial. Transplant. 2008. Vol. 23, N 4. P. 1252—1256.
4. Ekstrom B., Peterson P. A., Berggard I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1975. Vol. 65, N 4. P. 1427—1433.
5. Babiker-Mohamed H. et al. // Scand. J. Immunol. 1991. Vol. 34, N 5. P. 655—666.

6. Серченя Т. С., Прядко А. Г., Свиридов О. В. // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 2. С. 361—368.
7. Logdberg L., Akerstrom B. // Scand. J. Immunol. 1981. Vol. 13, N 4. P. 383—390.
8. Allhorn M. et al. // Blood. 2002. Vol. 99, N 6. P. 1894—1901.
9. Larsson J., Allhorn M., Kerstrom B. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 432, N 2. P. 196—204.
10. Akerstrom B. et al. // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282, N 43. P. 31493—31503.
11. Berggard T. et al. // Eur. J. Biochem. 1997. Vol. 245, N 3. P. 676—683.
12. Flower D. R. // Biochem. J. 1996. Vol. 318, Pt 1. P. 1—14.
13. Flower D. R., North A. C., Sansom C. E. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1482, N 1—2. P. 9—24.
14. Skerra A. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1482, N 1—2. P. 337—350.
15. Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, 1999. 2nd ed.
16. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. Применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. М., 1980. — 582 с.
17. Arnold K. et al. // Bioinformatics. 2006. Vol. 22, N 2. P. 195—201.
18. Bursulaya B. D. et al. // J. Comput. Aided. Mol. Des. 2003. Vol. 17, N 11. P. 755—763.
19. Мажуль В. М., Кананович С. Ж., Серченя Т. С., Свиридов О. В. // Биофизика. 2007. Т. 52, № 3. С. 425—435.
20. Bohm G., Muhr R., Jaenicke R. // Protein Eng. 1992. Vol. 5, N 3. P. 191—195.
21. Abagyan R. A., Totrov M. M., Kuznetsov D. A. // J. Comp. Chem. 1994. Vol. 15. P. 488—506.
22. Verni R. et al. // Faseb J. 1993. Vol. 7, N 12. P. 1179—1184.
23. Beuckmann C. T. et al. // Biochemistry. 1999. Vol. 38, N 25. P. 8006—8013.
24. Breustedt D. A., Schonfeld D. L., Skerra A. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1764, N 2. P. 161—173.
25. Gasymov O. K. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. Vol. 46, N 10. P. 3589—3596.
26. Kwasek A. et al. // Protein Expr. Purif. 2007. Vol. 53, N 1. P. 145—152.
27. Черницкий Е. А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. Минск, 1972. — 278 с.
28. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. Киев, 1988. — 280 с.

T. S. SERCHENYA, O. V. SVIRIDOV

THE PECULIARITIES OF TRYPTOPHAN RESIDUES MICROENVIRONMENT IN THE TERTIARY STRUCTURE OF HUMAN ALPHA-1-MICROGLOBULIN

Summary

By means of a fluorimetric analysis of the three-dimensional structure of human alpha-1-microglobulin (A1M), a lipocalin family protein, the microenvironment of the tryptophan residues and their accessibility to solvent molecules were characterized for the first time. Based on A1M tertiary structure computer modeling and the data on protein fluorescence quenching titration with acrylamide and iodide ions, it was concluded that the tryptophan residues of the protein molecule are substantially buried. It was found the fast intramolecular mobility of A1M associated with the fluctuations of protein structure in a nanosecond time range.

УДК 539.431

*Н. А. ДОКУКОВА¹, Е. Н. КАФТАЙКИНА¹, П. Н. КОНОН²***СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТРЕХ МЕТОДОВ РАСЧЕТА
МНОГОЭЛЕМЕНТНЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ
КОЛЕБАТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ**¹*Объединенный институт машиностроения НАН Беларуси*²*Белорусский государственный университет**(Поступила в редакцию 15.09.2009)*

Представлена новая методика последовательного применения дифференциальных операторов для исследований динамических характеристик виброамортизаторов, используемых в качестве подвесок силовых агрегатов автомобильной техники, выведены основные аналитические зависимости между параметрами колебательной системы, обеспечивающие оптимальную настройку виброизолятора машиностроительной конструкции. Эти зависимости позволяют эффективно управлять процессами вибрации, настраивать области повышенного гашения на необходимые частоты. Проведен сравнительный анализ трех методов расчета многоэлементных механических колебательных систем: метода импеданса, метода цепных динамических систем и метода последовательного применения дифференциальных операторов.

Введение. Динамические свойства многоэлементной системы достаточно сложно проанализировать с целью управления ими. В статье представлена новая методика последовательного применения дифференциальных операторов для исследований динамических характеристик виброамортизаторов, используемых в качестве подвесок силовых агрегатов автомобильной техники, выведены основные аналитические зависимости между параметрами колебательной системы, обеспечивающие оптимальную настройку виброизолятора машиностроительной конструкции. Эти зависимости позволяют эффективно управлять процессами вибрации, настраивать области гашения на необходимые частоты. Проведен сравнительный анализ трех методов расчета многоэлементных механических колебательных систем: метода импеданса, метода цепных динамических систем и метода последовательного применения дифференциальных операторов.

Исследования особенностей многоэлементных механических колебательных систем тремя степенями свободы. При проектировании и эксплуатации машин, содержащих вращающиеся элементы зубчатых колес трансмиссий с гидродинамическими опорными подшипниками скольжения, сталкиваются

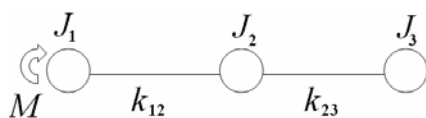


Рис. 1. Динамическая схема фрагмента вращающихся зубчатых колес трансмиссий мобильного средства

с проблемой неустойчивой работы [1], причиной которой является прецессионная вибрация с частотой, соответствующей половине угловой скорости вращения. Динамическая модель (рис. 1) механических колебаний [2] приводится к математической (1) и принимает вид

$$\begin{aligned}\ddot{f}_1 &= -c_{11} f_1 + c_{12} f_2 + c_{13} f_3 + F_1, \\ \ddot{f}_2 &= c_{21} f_1 - c_{22} f_2 + c_{23} f_3, \\ \ddot{f}_3 &= c_{31} f_1 + c_{32} f_2 - c_{33} f_3,\end{aligned}\quad (1)$$

где $f_1(t)$, $f_2(t)$, $f_3(t)$ – углы поворота зубчатых колес; $c_{11} = 10$, $c_{12} = 10$, $c_{13} = 0$, $c_{21} = 5$, $c_{22} = 205$, $c_{23} = 200$, $c_{31} = 0$, $c_{32} = 8$, $c_{33} = 8$ – квадраты угловых скоростей; $F_1 = 5$ – угловое ускорение приложенного внешнего момента вращения. Начальные условия при $t = 0$: $f_1(t) = 0,5$, $f_2(t) = 1,3$, $f_3(t) = 8,5$, $f_1'(t) = 7$, $f_2'(t) = 6$, $f_3'(t) = 4$. Физические параметры динамической схемы на рис. 1 выбраны произвольно: $J_1 = 10$ кг·м², $J_2 = 2$ кг·м², $J_3 = 5$ кг·м², $k_{12} = 100$ кг·м²/с², $k_{23} = 400$ кг·м²/с², $M = 50$ н·м.

Последовательно применяя операторы L_i ($i = \overline{1,3}$) к дифференциальным уравнениям (1) относительно искомых функций f_i , получаем новую систему трех несвязанных дифференциальных уравнений шестого порядка:

$$\begin{aligned}\left(\frac{d^6}{dt^6} f_1(t)\right) + 223\left(\frac{d^4}{dt^4} f_1(t)\right) + 2120\left(\frac{d^2}{dt^2} f_1(t)\right) &= -200, \\ \left(\frac{d^6}{dt^6} f_2(t)\right) + 223\left(\frac{d^4}{dt^4} f_2(t)\right) + 2120\left(\frac{d^2}{dt^2} f_2(t)\right) &= -200, \\ \left(\frac{d^6}{dt^6} f_3(t)\right) + 223\left(\frac{d^4}{dt^4} f_3(t)\right) + 2120\left(\frac{d^2}{dt^2} f_3(t)\right) &= -200.\end{aligned}\quad (2)$$

Точные решения динамической модели (1) и (2), соответствующие вынужденным колебаниям механической системы, изображены на рис. 2.

Для приведенного примера получаются достоверные результаты при решении неоднородной системы дифференциальных уравнений (2). Точные решения неоднородной системы дифференциальных уравнений (1), полученные с помощью процедур пакетов прикладных программ, для углов поворота зубчатых колес $f_1(t)$, $f_2(t)$, $f_3(t)$ трансмиссии с приложенным к ней постоянным

внешним моментом вращения, соответствующие вынужденным колебаниям механической системы, совпадают с представленными на рис. 2. Точность расчетов составляет наперед заданную величину погрешности равную 10^{-72} .

Фазовые траектории динамических моделей (1) и (2) вынужденных колебаний механической системы изображены на рис. 3.

Представленная методика исследования сложных динамических механизмов с помощью последовательного применения дифференциальных операторов является достоверной и точной. Она позволяет оценить качество и устойчивость движений по известным коэффициентам общей математической модели [3]. Судя по виду характеристического полинома, $a_0 = 0$, $a_1 = 0$, $a_2 = 2120$, $a_3 = 0$, $a_4 = 223$,

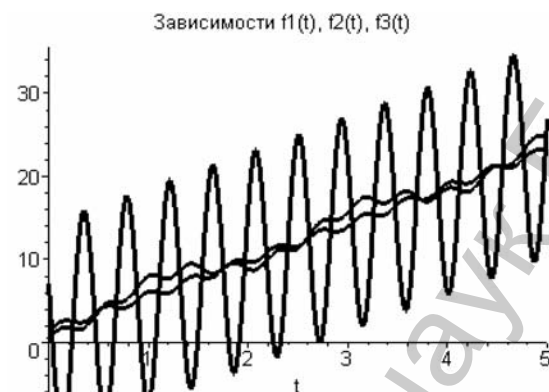


Рис. 2. Точные решения $f_1(t), f_2(t), f_3(t)$ углов поворота зубчатых колес трансмиссии с приложенным к ней постоянным внешним моментом вращения, соответствующие вынужденным колебаниям механической системы (2)

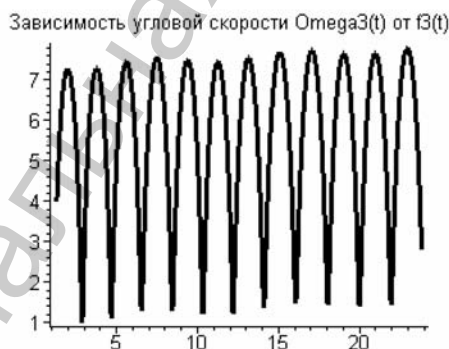
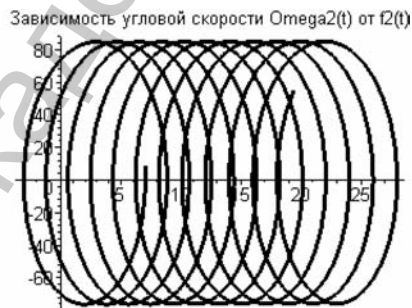
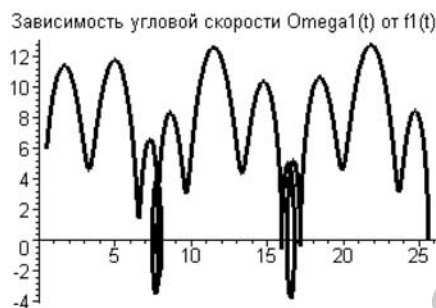


Рис. 3. Фазовые траектории решений $f_1(t), f_2(t), f_3(t)$ (углов поворота зубчатых колес трансмиссии) вынужденных колебаний механической системы

$a_5 = 0$, $a_6 = 1$, необходимые $a_0 / a_2 < a_1 / a_3 < a_2 / a_4 < a_3 / a_5 < a_4 / a_6$ и достаточные условия устойчивости динамической системы $W_k = a_k a_{k+1} / a_{k-1} a_{k+2} > 1$ не выполняются, $k = \overline{1, 4}$. Этот механический объект в практическом применении не обладает запасом устойчивости и качества.

Для дальнейшего анализа способов приведения многоэлементных динамических моделей к простым видам целесообразно рассмотреть гармонические составляющие точных решений $f_1(t)$, $f_2(t)$, $f_3(t)$ (рис. 4) систем дифференциальных уравнений (1) или (2).

Анализ методов импеданса и цепных динамических систем для расчета многоэлементных динамических конструкций. Рассмотрим два способа приведения многоэлементных динамических систем. Для определения и исследования обобщенных характеристик (динамических жесткостей и коэффициентов передачи нагрузок колебательных систем) применимы методы импеданса [4] и методы приведения цепных динамических систем [2].

Метод импеданса. Достаточно сложные механические системы анализируются методами, существенно упрощающими связи между сочлененными элементами конструкций. Эти методы называются методами расчета полного механического сопротивления или импеданса, позволяют проводить закончен-

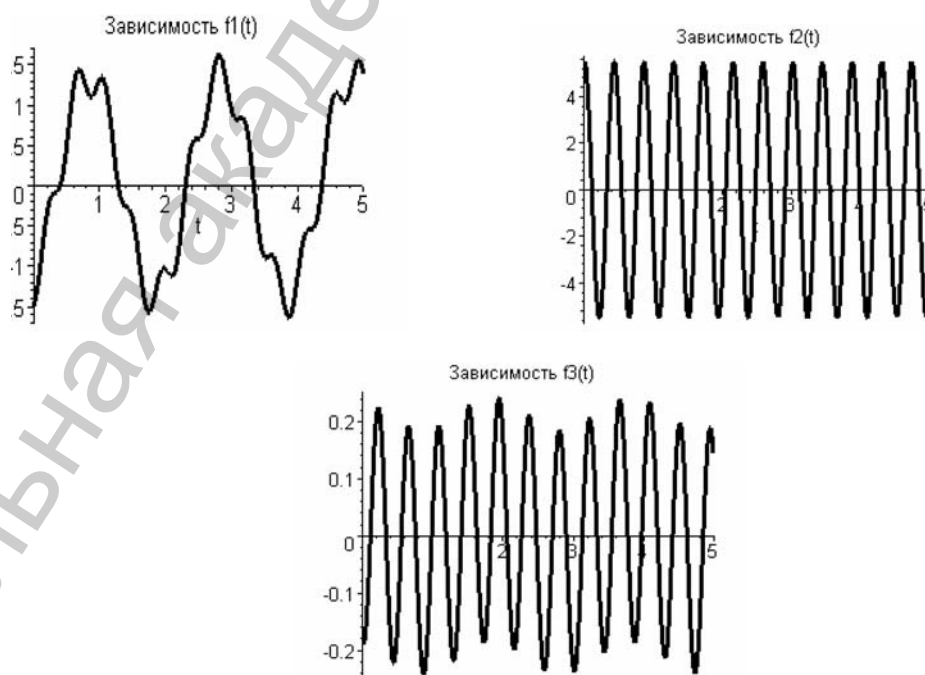


Рис. 4. Гармонические составляющие решений $f_1(t)$, $f_2(t)$, $f_3(t)$ — углов поворота зубчатых колес трансмиссии без постоянных, квадратичных и линейно зависящих от параметра t слагаемых

ный анализ движения и сил, действующих на каждую часть физической системы, причем, дифференциальные уравнения механики Ньютона становятся алгебраическими уравнениями.

Дифференциальные уравнения движения линейной механической системы выражаются через значения возмущающей силы, ускорения, скорости и величины перемещений элементов системы. В случае возмущения линейной системы синусоидальной силой, наблюдается устойчивая реакция системы в виде синусоидального ускорения, скорости и перемещения на частоте возбуждения при постоянном фазовом отношении с возмущающей силой. Зависимость между возмущающей силой и параметрами движения в различных точках системы выражается алгебраическими уравнениями, содержащими комплексные числа. Характеристики силы и движения системы рассмотрены ниже.

Полным механическим сопротивлением, или импедансом Z движущей точки является отношение движущей силы F , действующей на систему, к возникающей при этом скорости v системы,

$$Z = \frac{F}{v}. \quad (3)$$

Импеданс упругой пружины

$$Z_k = \frac{F}{v} = \frac{F_0 e^{i\omega t}}{\frac{F_0}{k} e^{i\omega t}} = k, \quad (4)$$

где k — жесткость пружины. Величина $e = 1/k$ является податливостью пружины.

Импеданс демпфирующего элемента с коэффициентом демпфирования c

$$Z_c = \frac{F_0 e^{i\omega t}}{i\omega F_0 e^{i\omega t} / c} = \frac{c}{i\omega}. \quad (5)$$

Импеданс массы m

$$Z_m = \frac{F_0 e^{i\omega t}}{F_0 e^{i\omega t} / i\omega m} = i\omega m. \quad (6)$$

При любом количестве параллельных элементов движущая сила равна сумме сил сопротивления

$$Z_{\text{общ}} = \sum_{i=1}^n Z_i, \quad (7)$$

где $Z_{\text{общ}}$ — импеданс параллельной системы из отдельных элементов Z_i .

При последовательном соединении элементов получим

$$\frac{1}{Z_{\text{общ}}} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{Z_i}, \quad (8)$$

где $Z_{\text{общ}}$ — импеданс элементов Z_i , соединенных последовательно.

Рассмотрим схему рис. 1, на которой все элементы – динамические моменты инерции J_1, J_2, J_3 и физические упругости c_{12} и c_{23} последовательно соединены.

Общий импеданс, или полное механическое сопротивление (8) схемы на рис. 1 будет таким:

$$Z_{\text{послед}} = \frac{1}{1/i\omega J_1 + 1/i\omega J_2 + 1/i\omega J_3 - i c_{12} / \omega - i c_{23} / \omega} = \frac{i\omega C_{\text{общ}} J_{\text{общ}}}{C_{\text{общ}} - \omega^2 J_{\text{общ}}}, \quad (9)$$

$$C_{\text{общ}} = \frac{c_{12} c_{23}}{c_{12} + c_{23}} \quad \text{и} \quad J_{\text{общ}} = \frac{J_1 J_2 J_3}{J_1 J_2 + J_1 J_3 + J_2 J_3}. \quad (10)$$

Выделим мнимую (реактивную) и действительную (активную) компоненты импеданса в формуле (9): $Z = Z_1 + i Z_2$. Для рассматриваемого варианта (рис. 1) общий импеданс имеет только одну реактивную составляющую Z_2 . Исходя из полученного выражения для импеданса, получаем $\omega_1^* = \sqrt{C_{\text{общ}} / J_{\text{общ}}} = 8$, где $C_{\text{общ}} = 80 \text{ кг} \cdot \text{м}^2 / \text{с}^2$ и $J_{\text{общ}} = 1,25 \text{ кг} \cdot \text{м}^2$.

Общее уравнение обобщенной механической системы примет вид

$$J_{\text{общ}} \ddot{f}(t) = - C_{\text{общ}} f(t) + M_{\text{moment}}, \quad (11)$$

где $M_{\text{moment}} = 50 \text{ н} \cdot \text{м}$. Решением дифференциального уравнения (11) является зависимость

$$f(t) = 0,77083325 \sin(8t) + 3,2041666 \cos(8t) + 0,0625. \quad (12)$$

Закономерность (12) носит обобщающий характер и выражает колебательную зависимость механической системы без учета плавности хода и равномерного закручивания вала трансмиссии (рис. 5).

Сравним усредненные характеристики обобщенного движения механической системы (12) с моделью (2) на рис. 2. Частота собственных колебаний приведенной схемы по методу импеданса $\omega_1^* = 8 \text{ рад/с}$ является средним значением между двумя точными, реализуемыми в настоящей модели частотами

$\omega_1 = 3,154 \text{ рад/с}$, $\omega_2 = 14,596 \text{ рад/с}$.

Амплитуду колебаний решения (12) также можно считать средней между $|f_1(t)| = 1,5 \text{ рад}$, $|f_2(t)| = 5,0 \text{ рад}$ и $|f_3(t)| = 0,25 \text{ рад}$. Оценим общую погрешность между точными решениями $f_1(t)$, $f_2(t)$,

$f_3(t)$ и приведенной обобщенной характеристикой движения механической системы $f(t)$ за время $t = 5 \text{ с}$:

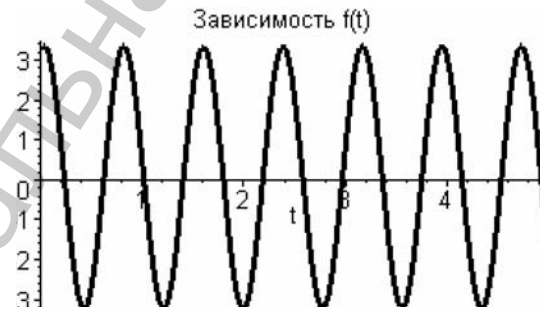


Рис. 5. Общий вид движения механической системы, полученный методом импеданса

$$\frac{1}{5} \int_0^5 |f_1(t) - f(t)| dt = 0,06676 \text{ рад}, \quad \frac{1}{5} \int_0^5 |f_2(t) - f(t)| dt = 0,19684 \text{ рад},$$

$$\frac{1}{5} \int_0^5 |f_3(t) - f(t)| dt = 0,15436 \text{ рад}. \quad (13)$$

Все интегральные оценки меньше 0,2 рад.

Метод цепных динамических систем. Метод цепных динамических систем – упрощения сложной механической системы основан на уравнивании потенциальных и кинетических энергий механической системы – оригинала и приведенной динамической системы [2] вида

$$J_{12} \ddot{f}_{12} = -c_{123} f_{12} + c_{123} f_{23} + M_{moment},$$

$$J_{23} \ddot{f}_{23} = c_{123} f_{12} - c_{123} f_{23}, \quad (14)$$

где $f_{12}(t)$, $f_{23}(t)$ – новые углы поворота зубчатых колес; $c_{123} = \frac{c_{12}c_{23}}{c_{12} + c_{23}} = 80 \text{ кг} \cdot \text{м}^2/\text{с}^2$,

$$J_{12} = J_1 + J_2 \frac{c_{12}}{c_{12} + c_{23}} = 10,4 \text{ кг} \cdot \text{м}^2, \quad J_{23} = J_3 + J_2 \frac{c_{23}}{c_{12} + c_{23}} = 6,6 \text{ кг} \cdot \text{м}^2.$$

Начальные условия при $t = 0$: $f_{12}(t) = 0,47 \text{ рад}$, $f_{23}(t) = 1,096 \text{ рад}$, $f_{12}'(t) = 3,517 \text{ рад/с}$, $f_{23}'(t) = 2,72 \text{ рад/с}$.

Решением системы дифференциальных уравнений (14) для приведенных углов поворота зубчатых колес трансмиссии являются

$$f_{12}(t) = 0,06953497102 \sin(4,451238008 t) - 0,2538993002 \cos(4,451238008 t) +$$

$$0,7205659602 + 0,1470588235 t^2 + 3,207723294 t, \quad (15)$$

$$f_{23}(t) = -0,1095702574 \sin(4,451238008 t) + 0,4000837458 \cos(4,451238008 t) +$$

$$0,1470588235 t^2 + 3,207723294 t + 0,6963012543.$$

На рис. 6 представлены решения (15), значительно отличающиеся от точных, полученных по формулам (3) и изображенных на рис. 2.

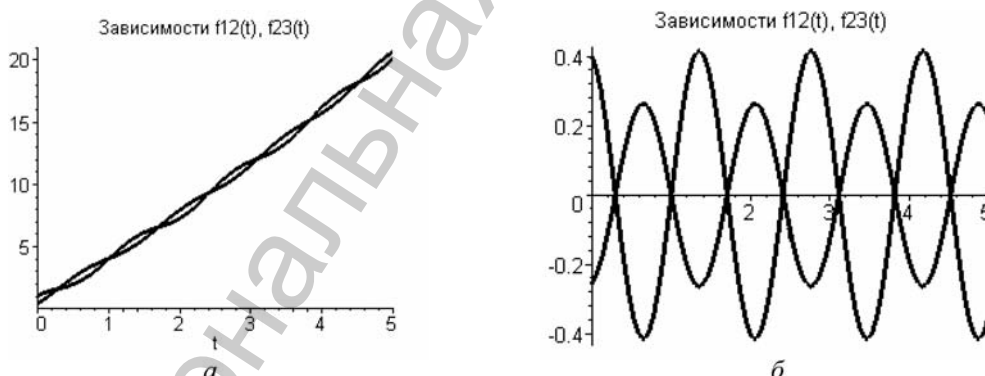


Рис. 6. Зависимости решений колебаний механической системы, полученные методом цепных динамических систем (а), и гармоническая составляющая того же решения (б)

Фазовые траектории, полученные методом цепных динамических систем (рис. 7), значительно отличаются от точных, представленных на рис. 4, как по величинам, так и по частотам.

Сравним усредненные характеристики приведенной механической системы (15) с точными решениями (3) для модели (1) на рис. 1. Частота собственных колебаний приведенной схемы $\omega_1^* = 4,451238008$ рад/с не является средним значением между двумя точными, реализуемыми в настоящей модели, частотами $\omega_1 = 3,154$ рад/с, $\omega_2 = 14,596$ рад/с. Амплитуды колебаний решений (15) $|f_{12}(t)| = 0,2538993002$ рад и $|f_{23}(t)| = 0,4000837458$ рад нельзя считать средними между $|f_1(t)| = 1,5$ рад, $|f_2(t)| = 5,0$ рад и $|f_3(t)| = 0,25$ рад. Оценим общие погрешности между точными решениями $f_1(t), f_2(t), f_3(t)$ (3) и приведенными решениями $f_{12}(t)$ и $f_{23}(t)$ за время $t = 5$ с:

$$\begin{aligned} \frac{1}{5} \int_0^5 |f_1(t) - f_{12}(t)| dt &= 3,01744207 \text{ рад}, & \frac{1}{5} \int_0^5 |f_2(t) - f_{12}(t)| dt &= 2,396799098 \text{ рад}, \\ \frac{1}{5} \int_0^5 |f_3(t) - f_{12}(t)| dt &= 2,427484112 \text{ рад}, & \frac{1}{5} \int_0^5 |f_1(t) - f_{23}(t)| dt &= 3,065217844 \text{ рад}, \\ \frac{1}{5} \int_0^5 |f_2(t) - f_{23}(t)| dt &= 2,444574872 \text{ рад}, & \frac{1}{5} \int_0^5 |f_3(t) - f_{23}(t)| dt &= 2,475259886 \text{ рад}. \end{aligned} \quad (16)$$

Все интегральные оценки в 10 раз больше, чем аналогичные оценки, полученные сравнением точных расчетов и расчетов, полученных методом полного механического сопротивления.

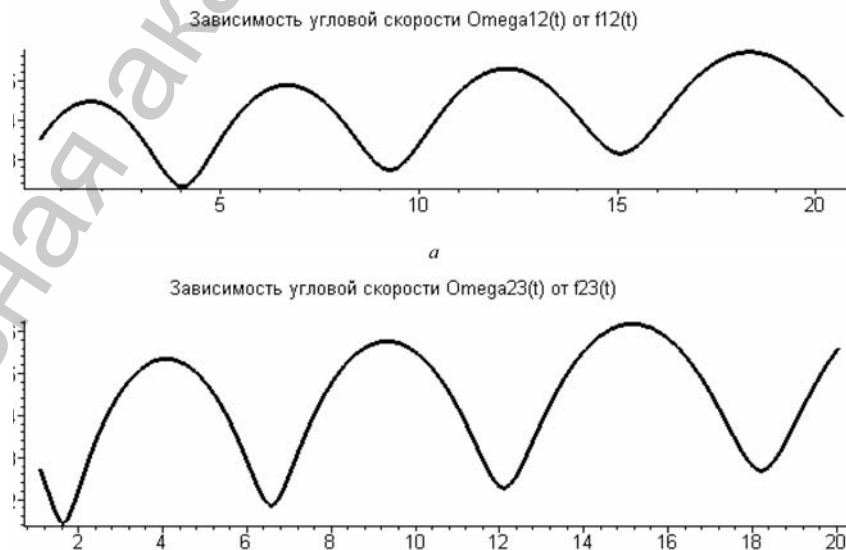


Рис. 7. Фазовые траектории решений $f_{12}(t)$ и $f_{23}(t)$: $a - \omega_{12}(f_{12}(t))$, $b - \omega_{23}(f_{23}(t))$

Выводы. На основании проведенного анализа следует отметить, что метод полного механического сопротивления достаточно простой в применении к многоэлементным механическим конструкциям, позволяет заменить сложные конструкции эквивалентной схемой с двумя основными составляющими активного и реактивного сопротивлений, удобен для целей предварительных исследований. Его погрешность по сравнению точными значениями динамических характеристик рассматриваемых конструкций в 10–15 раз меньше, чем аналогичная оценка метода цепных динамических систем. Для получения наиболее достоверных результатов вибронгруженности многоэлементных динамических систем целесообразнее пользоваться методом импеданса по сравнению с методом цепных динамических систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты № T02P-133, T06P-153).

Литература

1. Фролов К. В., Тихонов В. А., Чистяков А. Г. и др. // Проблемы машиностроения и надежности машин. 2001. № 4. С. 98–103.
2. Ривин Е. И. Динамика привода станков. М., 1966.
3. Докучкова Н. А., Кафтайкина К. // Euromech colloquium 495 «Advances in simulation of multibody system dynamics», 18–21 Febr. 2008. Bryansk, 2008. P. 29–30.
4. Докучкова Н. А., Конон П. Н. // ИФЖ. 2003. Т. 76, № 6. С. 115–118.

N. A. DOKUKOVA, E. N. KAFTAIKINA, P. N. KONON

COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE CALCULATION METHODS OF THE MULTIBODY MECHANICAL VIBRATION SYSTEMS

Summary

The vibro-isolators are used as the power unit suspensions of the motor transport. A new method of series using differential operators to research dynamic characteristics of vibro-isolator is presented. Important analytic dependences between vibration system parameters providing optimal tuning of the machine-building construction vibro-isolator were deduced. These dependences are allowed to manage vibration processes efficiently, to tune increased antihunting domains in necessary frequencies. Comparative analysis was conducted for the three following calculation methods of the multibody mechanical vibration systems: method of the impedance, chain dynamic systems methods and consistent using of the differential operators.

УДК 621.382; 77.001.66

Г. Д. АЛЕКСЕЕВ¹, М. А. БАТУРИЦКИЙ², Ю. И. ДАВЫДОВ¹,
О. В. ДВОРНИКОВ², А. А. ПИСКУН³, А. В. ТЕРЛЕЦКИЙ²,
В. В. ТОКМЕНИН¹, В. А. ЧЕХОВСКИЙ², Ю. Ф. ШУЛЬГЕВИЧ²

ПОЛУЗАКАЗНАЯ ИНТЕГРАЛЬНАЯ МИКРОСХЕМА ТРАНСИМПЕДАНСНОГО УСИЛИТЕЛЯ-ДИСКРИМИНАТОРА ДЛЯ ГАЗОРАЗРЯДНЫХ ДЕТЕКТОРОВ

¹ Объединенный институт ядерных исследований

² Национальный научно-учебный центр физики частиц и высоких энергий БГУ

³ Международный государственный экологический университет им. А. Д. Сахарова

(Поступила в редакцию 04.12.2009)

На специализированном аналоговом базовом матричном кристалле АБМК_1_3 создана полузаказная интегральная микросхема AD-1.3, состоящая из трансимпедансного усилителя Ampl-1.3 и компаратора Disc-1.4. Микросхема AD-1.3 обладает большим усилением, устойчивостью к самовозбуждению, высоким быстродействием (время нарастания и спада импульса на выходе усилителя составляют соответственно $\tau_n = 4$ и $\tau_c = 6$ нс, минимальная задержка канала усиления-дискриминации $T_D = 6,2$ нс, фронты выходных импульсов дискриминатора при нагрузке 110 Ом равны $\tau_n = 2,2$ и $\tau_c = 1,3$ нс соответственно) и низким уровнем шумов ($I_{noise} = 24 + 0,39C_D(n\Phi)$). Разработан электронный модуль считывания сигналов ADB-1 на четырехслойной печатной плате размером 25×14 мм, допускающий установку внутри отдельных дрейфовых трубок и в концевиках многоканальных минидрейфовых трубок (МДТ). Модуль ADB-1 прошел испытания в ОИЯИ в составе макета мюонного детектора на основе МДТ.

Введение. В современной ядерной физике (в данном случае этот термин применяется широко — в физике частиц высоких, промежуточных и низких энергий, физике космических лучей, дозиметрии и т. д.) газоразрядные проволочные детекторы составляют значительную часть экспериментального арсенала. Они используются во многих областях — от трековых детекторов до калориметрии. В таких детекторах сигнал несет информацию о координате, времени и выделенной энергии в событии. Это многообразие информации и обусловило широкое применение детекторов данного типа. В свою очередь, для возможности использования всей информации необходимо предъявлять жесткие требования к детектирующей электронике. Перечислим основные из них.

Надежность. Это требование вызвано тем обстоятельством, что современные установки, как правило, имеют большое количество каналов регистрации, что в основном связано с размерами установок. Единственным способом удовлетворить требованиям надежности является создание интегральных микросхем. В данном случае речь идет о заказной микросхеме AD-1.3 для удовлетворения определенного спектра требований, специфических для дальнейшего применения.

Высокая чувствительность. Это требование связано с малым уровнем сигнала в типичном детекторе — порядка 0,1–10 мкА (для минимально ионизирующей частицы).

Быстродействие. Данные детекторы часто используются для измерения времени пролета частиц, поэтому полоса частот должна быть от нескольких десятков до сотни мегагерц в предельном случае.

Линейность отклика. При измерении энерговыделения в детекторе (для целей калориметрии или дозиметрии) выходной сигнал усилителя должен иметь линейную зависимость от входа в пределах динамического диапазона (как минимум 20 дБ).

Наличие как аналогового, так и цифрового (логического) выходного сигнала с детектирующей электроники. Это упрощает построение последующих электронных систем регистрации и обработки сигналов и позволяет строить многоканальные системы.

Созданная полузаказная интегральная микросхема (ИМС) одноканального усилителя-дискриминатора AD-1.3 удовлетворяет всем вышеперечисленным требованиям к современной детекторной электронике. Ее основное использование в настоящее время предполагает испытания с различными типами газоразрядных проволочных детекторов. По завершении этого исследования возможно рассмотрение вопроса о применении данных микросхем в составе больших экспериментальных установок.

Структура ИМС AD-1.3. ИМС AD-1.3 содержит одноканальные трансимпедансный усилитель Ampl-1.3 и компаратор Disc-1.4, связываемые между собой внешними RC-цепями, позволяющими реализовать оптимальную для каждого конкретного детектора связь и задавать нужное значение порогового тока. Усилитель и компаратор имеют отдельное питание, что позволяет использовать их как совместно, так и по отдельности, увеличивая гибкость применения ИМС. Для минимизации временных и материальных затрат разработка выполнена на основе базового матричного кристалла АБМК_1_3, специализированного для аналоговых микросхем, используемых для считывания сигналов с детекторов, применяемых в ядерной физике [1; 2].

За исключением номиналов, ограничиваемых набором резисторов и размеров транзисторов на АБМК_1_3, схема электрическая принципиальная (СхЭП) Ampl-1.3 идентична схеме одного канала 8-канальной заказной ИМС Ampl-8.3, разработанной для модернизации передней мюонной системы эксперимента D0 (Фермилаб, г. Батавия, США) [3–5]. Поскольку данная ИМС продемонстрировала исключительную надежность работы и высокое качество электропараметров в течение почти 10 лет эксплуатации, при разработке Ampl-1.3 было принято решение сохранить все ее схемотехнические и топологические особенности.

СхЭП усилителя Ampl-1.3 приведена на рис. 1 (условные графические обозначения и наименования электрорадиоэлементов на рис. 1—3 соответствуют принятым в системе проектирования OrCAD). Усилитель трехкаскадный, головной каскад выполнен по схеме ОБ—ОК (q30, R21, q29), за ним следуют два дифференциальных усилительных каскада с резистивной нагрузкой, обеспечивающие дальнейшее усиление и формирование сигнала. Формирование осуществляется RC-цепочками в цепях эмиттеров (R16, R18, C1a, C1b и R17, R19, C2a, C2b) и резисторами коллекторной нагрузки (R12, R13 и R14, R15) в совокупности с их паразитными емкостями, а также входными и выходными емкостями транзисторов. Для согласования с дискриминатором на выходе усилителя включены эмиттерные повторители q25 и q26.

Имеется опорный каскад q22, R31, q11, полностью идентичный входному, включая диодную защиту от положительных (qp1, qp2) и отрицательных (JP1, JP2 и JP3, JP4) перегрузок. Он служит для задания режима на опорном входе первого дифференциального каскада, а также компенсирует действие синфазной помехи.

СхЭП дискриминатора Disc-1.4 показана на рис. 2. Дискриминатор выполнен по традиционной для данного класса устройств схеме — на основе дифференциальных усилителей в каскадном включении (q31, q33, q32, q45, R22, R23 и q35, q36, q38, q39, R10, R11), выходной каскад — дифференциальная пара (q52, q53) с открытым коллектором. Сдвиг уровней между каскадами осуществляется эмиттерными повторителями Q46, Q49, Q50, Q51 со стабилизаторами qd1, qd1—1, и qd2, qd2—1 на основе обратносмещенных эмиттерных переходов pnp-транзисторов. По сравнению с прототипом — компаратором Disc-8.3, разработанным одновременно с Ampl-8.3 для эксперимента D0 [5; 6], из второго дифференциального каскада схемы исключены конденсаторы 1,5 пф, увеличивающие минимальную длительность выходного сигнала, но приводящие к росту задержки срабатывания компаратора примерно на 5—10 нс.

Модуль ADB-1. Для работы ИМС AD-1.3 с реальными газовыми детекторами был разработан электронный модуль считывания сигналов ADB-1. ИМС монтировалась на четырехслойной печатной плате размерами 25×14 мм, при проектировании которой ставилась задача минимизации размеров для возможности ее размещения внутри одиночной трубки или в концевике блока из нескольких трубок типа восьмиканальной МДТ. Топология платы исключает возможность высоковольтного пробоя во входной цепи усилителя и замыкания токонесущих частей модуля на стенки трубки.

СхЭП модуля приведена на рис. 3. Входной сигнал подается на вход усилителя Ampl-1.3 через согласующий резистор R1 номиналом 25 Ом, прямой и инверсный выходы усилителя подключены к входам компаратора Disc-1.4 через конденсаторы C1 и C2 емкостью 10 нФ. Напряжение порога срабатывания подается на вход Thr платы через резистор 10 кОм. Дискриминатор имеет встроенную нагрузку 1 кОм в каждом плече, которая используется при пусконаладочных работах. Рабочей нагрузкой являются два резистора номиналом 56 Ом, подключенные на «землю» на другом конце кабеля, передающего цифровой сигнал дискриминатора в устройство обработки.

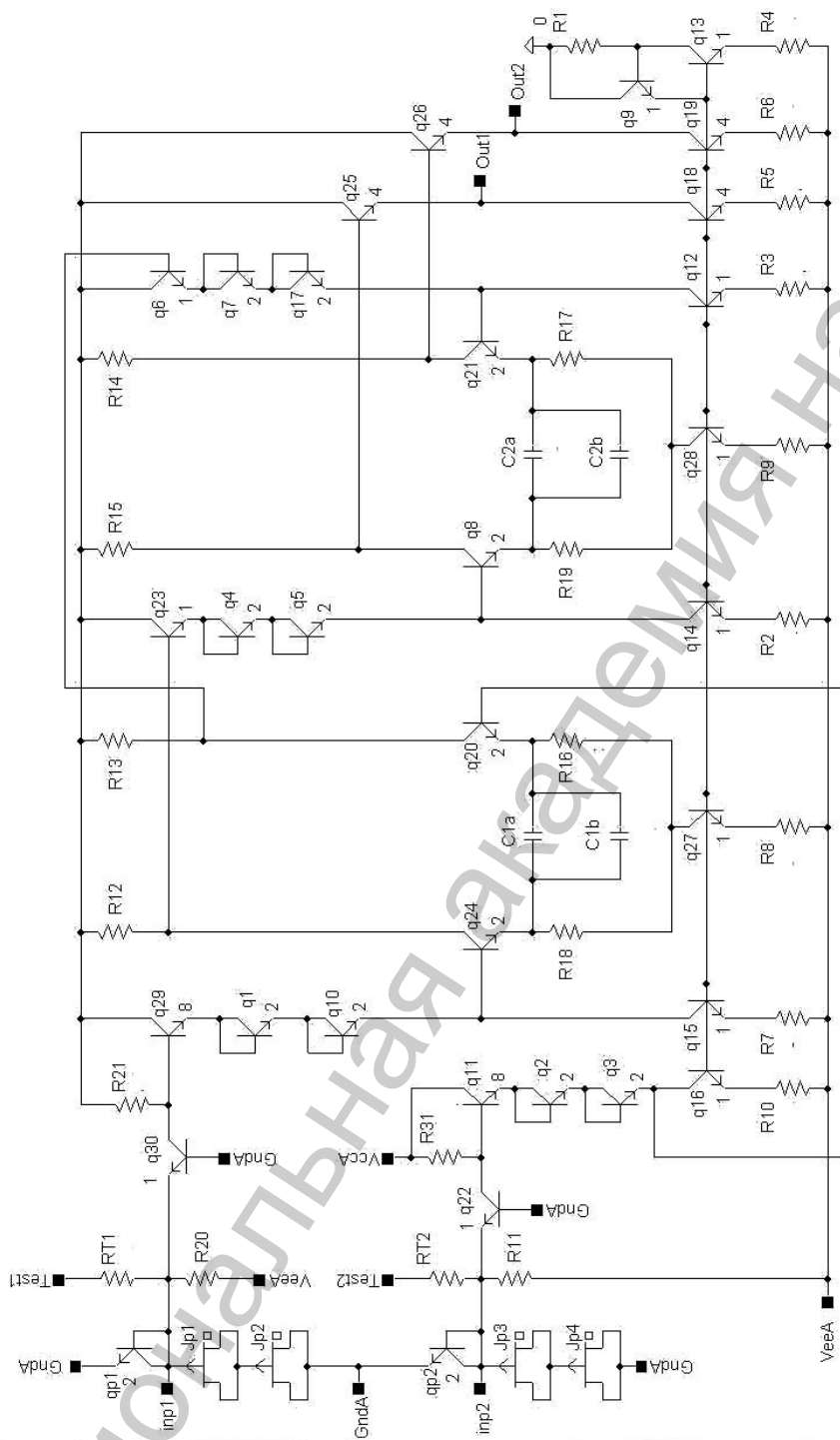


Рис. 1. Схема электрическая принципиальная усилителя Ampl-1.3

Національная Академия Наук Беларуси

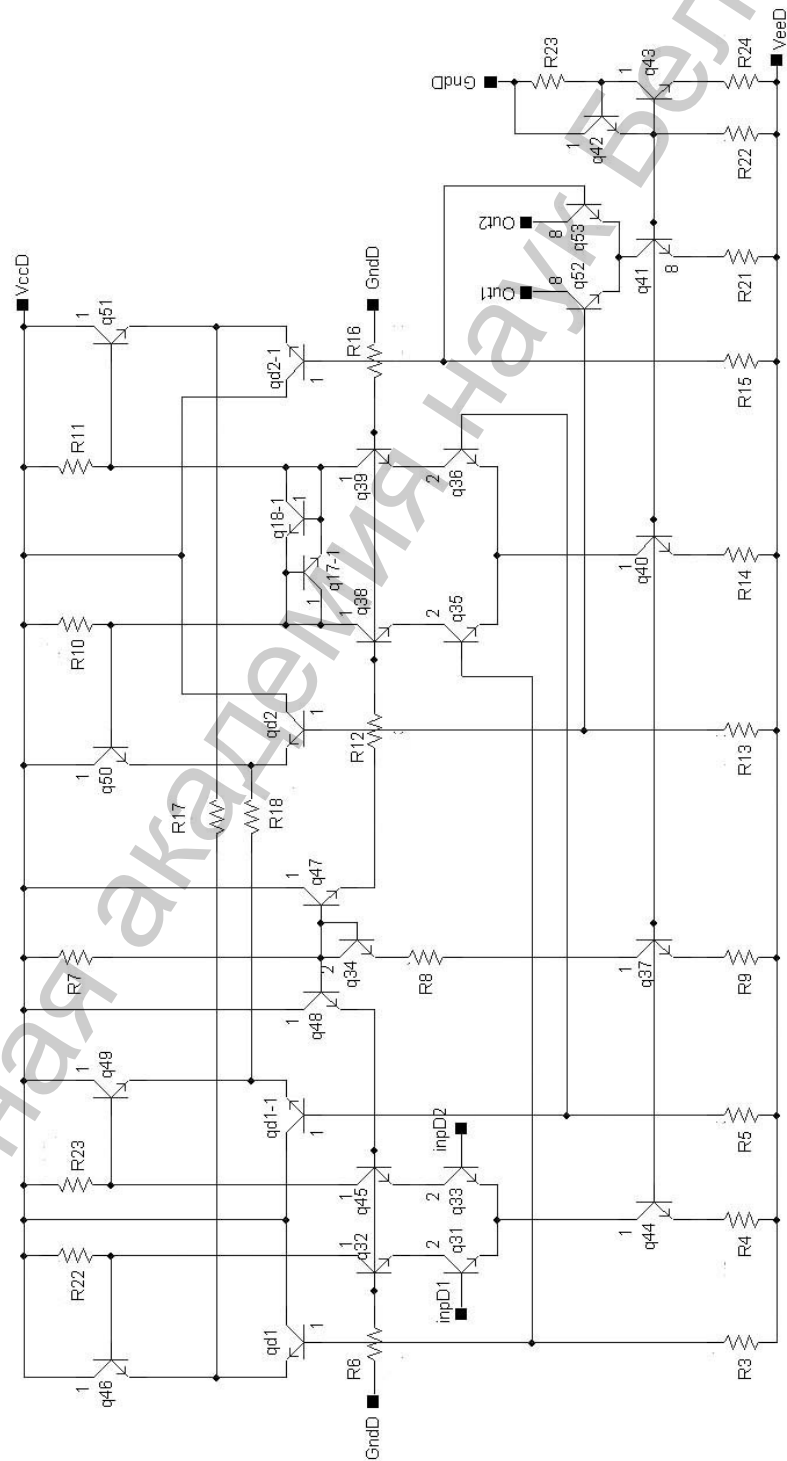


Рис. 2. Схема электрическая принципиальная дискриминатора Disc-1.4

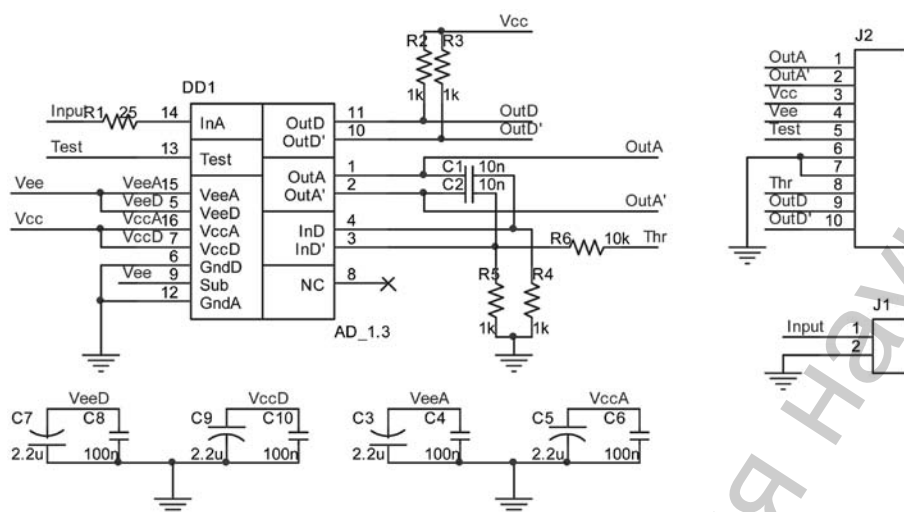


Рис. 3. Схема электрическая принципиальная модуля съема сигналов ADB-1

На разъем выведен также дифференциальный аналоговый выход усилителя (OutA, OutA'), что дает возможность в случае необходимости использовать дополнительно аналоговый сигнал для амплитудного анализа или вообще только одну усилительную часть ИМС AD-1.3.

Внешний вид модуля AD-1 приведен на рис. 4.

Электрические параметры ИМС усилителя-дискриминатора AD-1.3. Характеристики ИМС AD-1.3 и входящих в его состав усилителя Амр1-1.3 и компаратора Disc-1.4 измерялись на специальной тестовой печатной плате, а впоследствии в модуле ADB-1. Входной токовый импульс формировался с помощью токозадающего резистора, номинал которого при работе от генератора

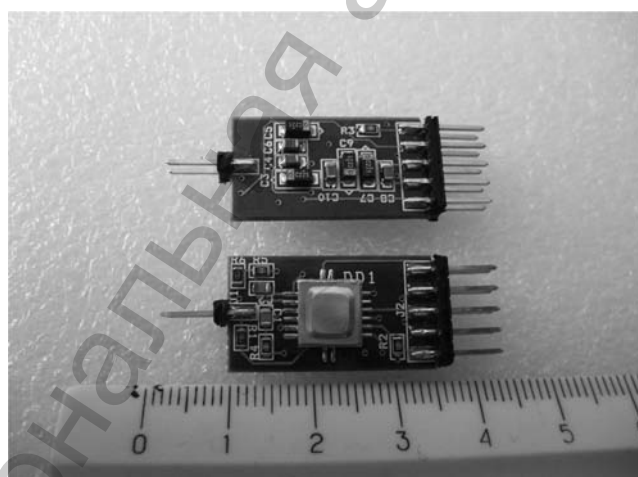


Рис. 4. Внешний вид модуля ADB-1

сигналов произвольной формы HP3351A выбирался равным 91 кОм, от импульсного генератора Г5-78 — 100 кОм. В предварительных испытаниях использовался также и номинал 10 кОм.

Результаты измерений приведены в таблице.

Характеристики ADB-1

Параметр	Значение
Усилитель Ampl-1.3	
Коэффициент преобразования, мВ/мкА	100 (50 на плечо)
I_{noise} в зависимости от емкости детектора, нА	$24 + 0,39C_D$ (пФ)
Длительность переднего фронта выходного сигнала, нс	≤ 4
Длительность спада выходного сигнала, нс	≤ 6
Задержка распространения сигнала, нс	3,2
Напряжение смещения между выходами, В	$\leq 1,5$
Динамический диапазон, дБ	58
Полярность входного сигнала	\pm
Входное сопротивление, Ом	43
Защита от высоковольтных выбросов	Да
Дифференциальный выход	Да
Выходная нагрузка, Ом, не менее	1000
Напряжение питания, В	$\pm 3...5$
Рассеиваемая мощность при питании $\pm 3...5$ В, мВт	19–83
Дискриминатор Disc-1.4	
Дрожание, нс	0,35
Задержка распространения сигнала при $U_{in-} = 0,1$ В, $U_{in+} = 1,0$ В, нс	3,0
Длительность нарастания/спада выходного импульса, нс	2,2/1,3
Выходная нагрузка, Ом	110
Рассеиваемая мощность при питании ± 5 В, мВт	92
Сквозной канал ADB-1	
Входное сопротивление, Ом	67
Точность временной привязки (фронт 5 нс по уровням 0,1–0,9, нс)	2,4
Задержка канала усиления–дискриминации, нс, при:	
$I_{thr} = 1$ мкА, $I_{in} = 10$ мкА	6,2
$I_{thr} = 5$ мкА, $I_{in} = 10$ мкА	25,5
Потребляемая мощность при напряжениях питания ± 5 В, мВт	175

По сравнению с прототипом Ampl-8.3 одноканальный усилитель Ampl-1.3 имеет меньший коэффициент преобразования, но более высокое быстродействие и меньшую задержку распространения, что объясняется особенностями базового матричного кристалла, на котором реализована ИМС AD-1.3.

График зависимости собственных шумов усилителя Ampl-1.3 от емкости детектора приведен на рис. 5. Поскольку размеры головного транзистора и его режим холостого хода примерно такие, как у Ampl-8.3, то и шумы их практически одинаковы.

Следует особо отметить способность работы Ampl-1.3 на большую емкостную нагрузку ($C_D = 820$ пФ), что делает его перспективным для применения с газоразрядными педовыми координатными детекторами [7].

Главным отличием дискриминатора Disc-1.4 от Disc-8.3 является существенно меньшее время задержки срабатывания (3 нс) при приведенном ко входу усилителя пороге $I_{thr} = 1$ мкА и входном токе $I_{in} = 10$ мкА, тогда как Disc-8.3

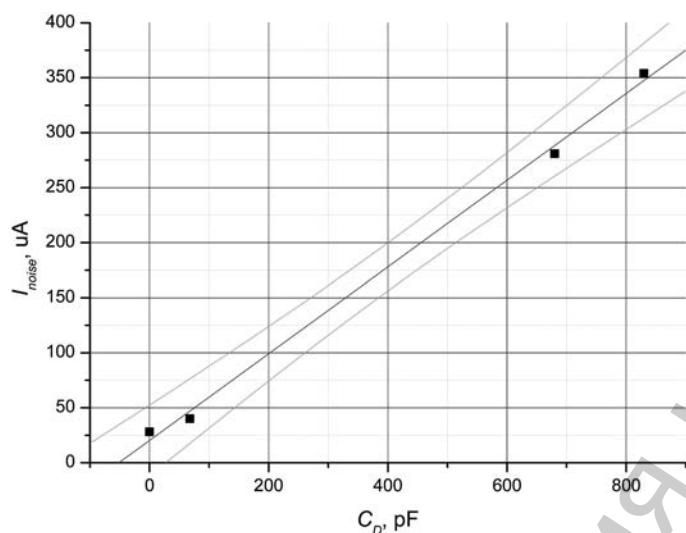


Рис. 5. Зависимость шумов Ampl-1.3 от емкости детектора

в тех же условиях имеет задержку 17 нс. Как оказалось, основной причиной увеличения быстродействия стало исключение резисторов и конденсаторов, увеличивающих минимальную длительность выходного импульса.

Для иллюстрации характеристик сквозного канала усиления–дискриминации на рис. 6 приведены осциллограммы сигналов на выходе усилителя (а) и дискриминатора (б) ИМС AD-1.3 при входном импульсе 10 мкА (нижние развертки). Верхние развертки — выход импульсного генератора Г5-78. Видно, что при пороге 1 мкА и превышении над порогом 9 мкА задержка распространения сигнала в усилителе равна 3,2 нс, задержка срабатывания дискриминатора — 3,0 нс, а задержка всего канала — 6,2 нс.

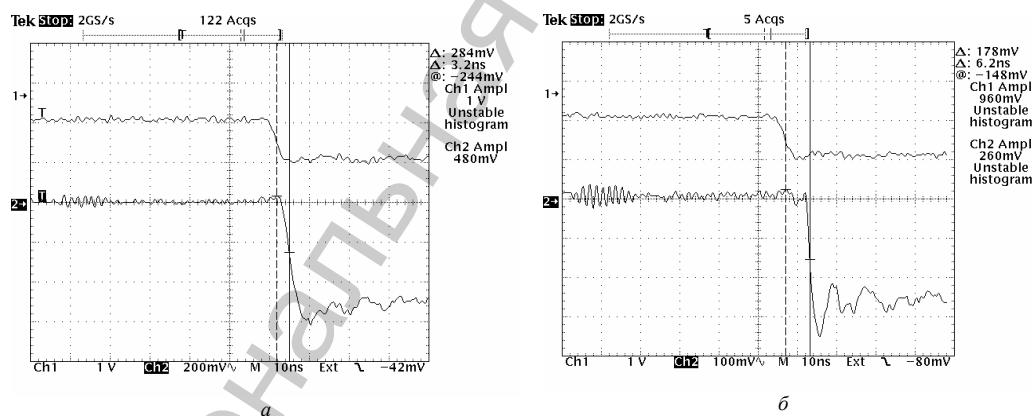


Рис. 6. Осциллограммы сигналов на выходе усилителя (а) и дискриминатора (б) ИМС AD-1.3 при входном токе 1 мкА (нижние развертки). Верхние развертки — выход импульсного генератора Г5-78

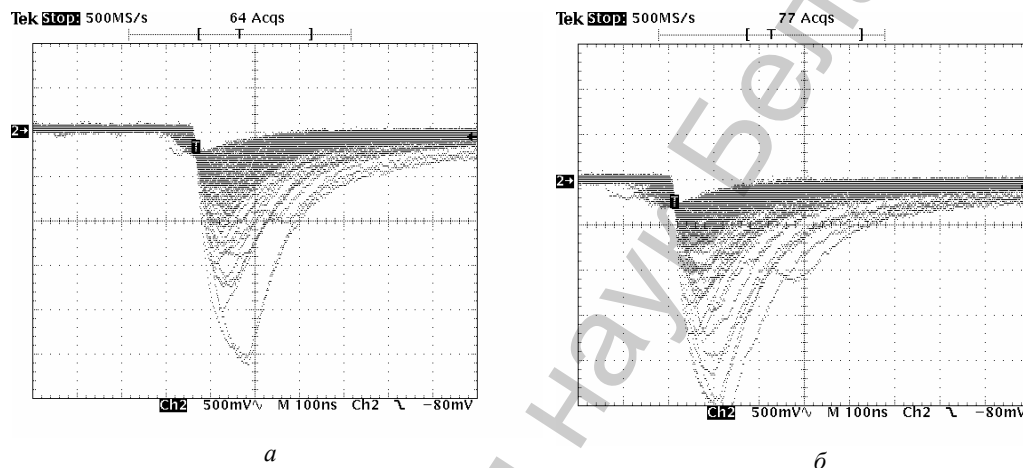


Рис. 7. Осциллограммы сигналов от космических мюонов (а) и фотонов гамма-излучения Co-60 (б)

Работа модуля ADB-1 с мини-дрейфовыми трубками. Исследование работы ADB-1 с МДТ проводилось на базе исследовательского стенда газоразрядных проволочных детекторов в лаборатории ядерных проблем ОИЯИ. Анодные проволочки МДТ объединялись схемой монтажного ИЛИ и подключались к входу усилителя через резистор 24 Ом, расположенный на плате ADB-1 и являющийся частью сопротивления, согласующего вход AD-1 с волновым сопротивлением МДТ (270 Ом). В МДТ использовалась рабочая газовая смесь $Ar : CO_2 = 70 : 30$. Измерения проводились с космическими мюонами и с гамма-излучением от источника ОСГИ Co-60. Сигналы от источника практически совпадают с сигналами от космических мюонов, что говорит о примерно одинаковой ионизации, производимой в газовой смеси. Это подтверждается осциллограммами, приведенными на рис. 7. Очевидно также и отсутствие насыщения для сигналов максимальной амплитуды. В дальнейшем это свойство (равенство сигналов) планируется использовать для оперативной проверки работоспособности МДТ с помощью данного источника при сборке и наладке больших систем (например, мюонной системы установки PANDA/FAIR).

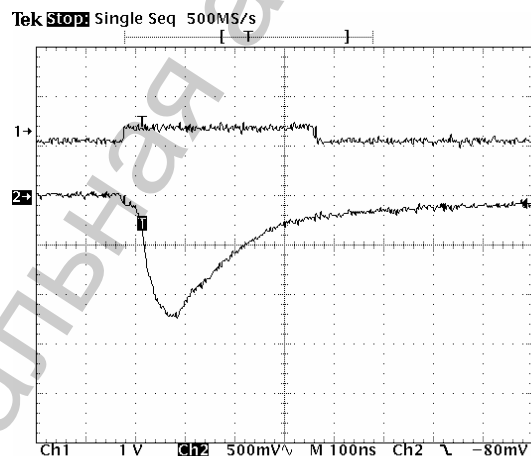


Рис. 8. Сигнал от космического мюона на выходе усилителя (нижняя развертка) и сигнал его регистрации на выходе компаратора (верхняя развертка)

На рис. 8 показаны сигналы от космического мюона с промежуточного аналогового и цифрового выхода модуля AD-1. Видна четкая фиксация дискриминатором момента прихода импульса.

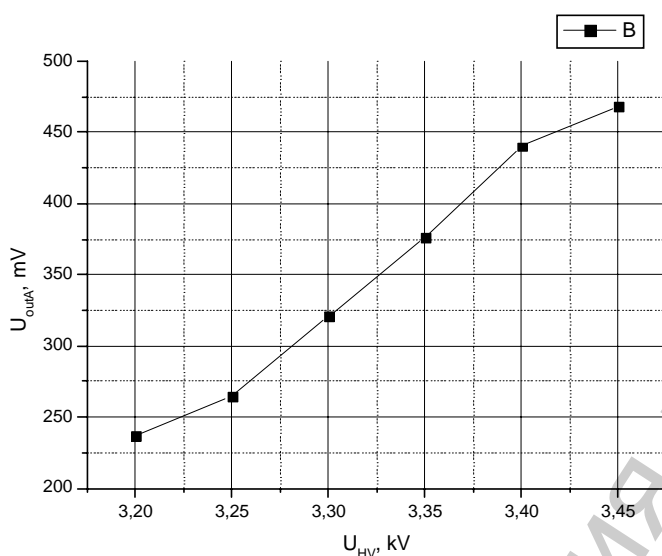


Рис. 9. Зависимость средней амплитуды аналогового выходного сигнала ИМС AD-1.3 от напряжения на анодных проволочках МДТ

Исследование работы МДТ с ADB-1 проводилось при различных значениях высокого напряжения на анодах МДТ. Зависимость средней амплитуды сигнала на выходе усилителя от высокого напряжения на анодных проволочках МДТ приведена на рис. 9. Она демонстрирует надежную работу МДТ с данной электроникой регистрации сигналов в рабочем диапазоне изменений напряжения высоковольтного питания, что обеспечивает достоверность результатов измерений.

Заключение. Испытания модуля ADB-1, проведенные с газоразрядным детектором типа МДТ, показывают, что он удовлетворяет требованиям, предъявляемым к электронным системам регистрации и обработки выходных сигналов перспективных детекторов для новых проектов по физике высоких энергий.

Результаты испытания микросхемы AD-1.3 в составе исследовательского стенда газоразрядных проволочных детекторов в лаборатории ядерных проблем ОИЯИ показали ее полную пригодность для использования с детекторами типа МДТ. Высокий коэффициент преобразования, быстродействие и надежность (не склонна к самовозбуждению) позволяют планировать использование данной микросхемы с различными детекторами, например, однокоординатной МДТ при считывании сигнала с проволоки (в закрытой геометрии — когда катод полностью экранирует анодную проволоку), двухкоординатной МДТ, при считывании как анодного сигнала, так и наведенного сигнала с внешнего электрода (в открытой геометрии — без катодной крышки, что частично устраняет экранировку проволоки и делает МДТ «прозрачной» для электромагнитного импульса), а также с дрейфовыми трубками и многопроволочными пропорциональными камерами.

Наличие у микросхемы AD-1.3 аналогового и цифрового выходов облегчает ее применение как для НИР по детекторам для физики высоких энергий в будущих проектах (в настоящее время это ILC — Международный линейный коллайдер), так и в текущих и планируемых, таких, например, как D0/FNAL, COMPASS/CERN и PANDA/FAIR. Почти во всех этих проектах присутствует группа участников разработки ИМС AD-1.3, и предполагается ее максимально широкое использование для развития трековых систем данных проектов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Объединенного института ядерных исследований (грант Ф07Д-007).

Литература

1. Baturitsky M. A., Dvornikov O. V., Tchekhovski V. A. ICCSC'02.1ST IEEE International Conference on Circuits and Systems for Communications. Proceedings. 26–28 June, 2002. St. Petersburg, Russia.
2. Baturitsky M. A., Dvornikov O. V., Tchekhovski V. A. // Nucl. Instr. and Meth. 2003. Vol. A498. — 443 p.
3. Alexeev G. D. et al. // Nucl. Instr. and Meth. 2001. Vol. A462. P. 494–505.
4. Alexeev G. D. et al. // Nucl. Instr. and Meth. 2001. Vol. A473. P. 269.
5. Abazov V. et al. // Nucl. Instr. and Meth. 2005. Vol. A552. P. 372–398.
6. Alexeev G. D. et al. // Nucl. Instr. and Meth. 1999. Vol. A423. P. 157–162.
7. Групен К. Детекторы элементарных частиц: Справ. пособие. Новосибирск, 1999. — 408 с.

G. D. ALEXEEV, M. A. BATURITSKY, Yu. I. DAVYDOV, O. V. DVORNIKOV, A. A. PISKUN, A. V. TERLETSKIY, V. V. TOKMENIN, V. A. TCHEKHOVSKI, Yu. F. SHULHEVICH

THE SEMICUSTOM INTEGRATED TRANSIMPEDANCE AMPLIFIER — DISCRIMINATOR MICROCIRCUIT FOR GAS-DISCHARGE DETECTORS

Summary

The integrated circuit AD-1.3 consisting of a transresistance amplifier Ampl-1.3 and comparator Disc-1.4 is designed on a specialized analogous Master-Slice Array ABMK_1_3. AD-1.3 possesses large amplification, resistance to self-excitation, high speed (time of leading and trailing edges of amplifier output signal are $\tau_l = 4$ and $\tau_r = 6$ ns, respectively, the minimal delay of the amplification/discrimination channel is $T_D = 6.2$ ns, discriminator output pulse edges are $\tau_l = 2.2$ and $\tau_r = 1.3$ ns, respectively, at a load 110 Ohm, and low noise level ($I_{noise} = 24 + 0.39C_D$ (pF)). The signal-readout electronic module ADB-1 mounted on a four-layer printed-circuit-board 25×14 mm has been designed. It can be mounted inside separate drift tubes or inside the end part of multichannel mini-drift tubes (MDT). ADB-1 has passed tests with a prototype of an MDT muon detector in JINR.

УДК 633.1:504.054

О. В. ЧИЖИК, М. К. МАЛЮШ

**ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА РАСТЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ
НА ТЕРРИТОРИЯХ С ПОВЫШЕННОЙ
РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКОЙ НАГРУЗКОЙ***Центральный ботанический сад НАН Беларуси**(Поступила в редакцию 14.07.2009)*

Показано, что в геноме растений разных систематических групп, подвергшихся как внешнему, так и внутреннему хроническому облучению, происходят изменения, связанные с частично неотреставрированными повреждениями в ДНК и ее связи с белками, изменения в размере клеток и ядер, а также в функционировании системы биосинтеза хлорофилла. Предложен экспресс-метод для биоиндикации территорий на основе определения полидезоксирибонуклеотидов в клеточных ядрах растений.

Введение. В результате аварии на Чернобыльской АЭС радиоактивному загрязнению подверглись обширные территории Беларуси, России, Украины и ряда других стран Европы. Анализируя характер чернобыльских выпадений, следует выделить две особенности — масштабность радиоактивного загрязнения и неоднородность распределения радиоактивных веществ по территории. В результате осадения радионуклидов были загрязнены как сельскохозяйственные угодья, так и природные экосистемы [1]. Хронический режим облучения, сложившийся на территории 30-километровой зоны ЧАЭС, затрудняет понимание природы лучевого поражения многолетних растительных организмов, так как радиочувствительность всех их компонентов претерпевает существенные изменения в течение годового цикла развития, к тому же некоторые радиоактивные вещества избирательно накапливаются в отдельных тканях и органах [2; 3]. Также существуют межвидовые и даже внутривидовые различия в накоплении радионуклидов в различных частях растений.

Интерпретация результатов осложняется и тем обстоятельством, что в ходе облучения, наряду с развитием эффектов поражения [4—9], протекают восстановительные процессы. И хотя растениям отводится роль переносчиков радионуклидов по пищевой цепочке «почва — растение — животное — человек», большинство данных относительно повреждающего действия ионизирующего излучения на молекулу ДНК и геном растения, а также биологической роли этих повреждений, получены на клетках животных и микроорганизмов.

Если говорить о высших растениях, то такие сведения малочисленны и касаются, в основном, влияния на отдельные морфофизиологические и биохимические параметры растений, преимущественно дикорастущих видов.

Важными интегральными показателями качества среды обитания общепринято считаются биоиндикационные. Эти показатели отражают неспецифические ответы биологических систем на разнообразные виды антропогенного влияния, что позволяет рассматривать их в качестве индикаторов сочетанного действия многих синхронно действующих антропогенных факторов. Биоиндикаторы — это организмы, присутствие, количество или особенности развития которых служат показателями естественных процессов, условий или антропогенных изменений среды. Под биологическими индикаторами подразумеваются объекты (клетки, многоклеточные организмы, виды, популяции, сообщества организмов), которые позволяют судить о состоянии среды обитания. Сама же биоиндикация — это оценка качества среды обитания и ее отдельных характеристик по состоянию биоты в природных условиях. Только биологическая оценка дает возможность интегральной характеристики качества среды, находящейся под воздействием всего многообразия физических, химических и других факторов. Именно сами живые организмы несут наибольшее количество информации об окружающей их среде обитания: живой организм как биологическая система замыкает на себя все процессы, протекающие в экосистеме. Приоритетность биологической оценки качества среды определяется, кроме интегральности, получением непосредственной характеристики здоровья среды, ее пригодности для живых организмов, в том числе человека.

Так как радионуклиды, поступая из растений в организм животных и человека, могут накапливаться и оказывать неблагоприятное воздействие на здоровье, изучение данной проблемы, определение показателей и разработка системы биоиндикации территорий с разной степенью радиоэкологической нагрузки, выработка рекомендаций по устранению их негативного воздействия на растения, а также увеличение числа чувствительных тест-объектов на заражение территорий радионуклидами является весьма актуальной задачей, позволяющей более полно определять степень влияния радиации на геном организмов и проводить мониторинг загрязненных территорий с целью их рационального использования в сельском и лесном хозяйстве. Основываясь на существовании корреляции между числом повреждений ДНК, содержанием растворимых полидезоксирибонуклеотидов, уровнем накопления пигментов, показателях роста культуры тканей *in vitro*, структурой клеток и ядер растительной ткани и уровнем радиационного воздействия, мы применили современные молекулярно-биологические и биохимические методы исследования для разработки системы разноуровневой биоиндикации загрязненных территорий.

Цель работы — исследовать возможность использования цитоморфологических и физиолого-биохимических изменений в сельскохозяйственных и дикорастущих растительных объектах, вызванных радиоэкологическим воздействием, для разработки системы биоиндикации территорий с повышенной радиоэкологической нагрузкой.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили листья, семена и проростки (48-час., 7 и 14 дней проращивания) злаковых растений — тритикале (*Secalotriticum*), сорт Инесса; бобовых растений — люпин узколистный (*Lupinus angustifolius* L.), сорт Першацвет, а также листья березы повислой (*Betula pendula* Roth.), полученные с экспериментальных участков Полесского радиэкологического заповедника (г. Хойники, район дер. Бабчин) с радиационным фоном почвы 1750 кБк/м² и условно чистой зоны — территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси.

Изучение морфологии клеток проводили по методике N. Datta [10]. Осеваемые части проростков без эндосперма взвешивали, их 1-сантиметровые верхние части мацерировали по методике N. Datta [11] и получали суспензии разделенных клеток для цитометрического определения размера клеток. Ядра проростков выделяли по методике [12]. Площадь сечения клетки в фокальной плоскости оценивали как произведение ее длины на ширину, которые измеряли с помощью объект-микрометра МОВ-1-15^x под микроскопом МБИ-6 (ЛОМО). Результаты наблюдений обрабатывали в системах Statistica 5.0 и Statgraphics Plus.

Введение в культуру *in vitro* проводили следующим образом. Семена люпина проращивали в стерильных стаканах 7 дней на воде или среде МС (Мурасиге и Скуга [13]), содержащей 1 мг/л БАП. Из полученных проростков стерильно вычленили гипокотили, семядольные узлы, семядоли и помещали на среду культивирования (макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скугу, тиамин — 1,0 мг/л, пиридоксин — 1,0 мг/л, никотиновая кислота — 1,0 мг/л, инозит — 100 мг/л, сахароза — 2 и 0,7 %, агар Дифко — при pH 5,8). Наиболее активным индуктором каллусогенеза на эксплантах зародышей оказался ауксин 2,4-Д в концентрации 2 мг/л. Ткани выращивали в темноте при 25 °C и влажности 70 %. Частота каллусообразования для контрольных эксплантов близка к 100 %.

Введение в культуру *in vitro* тритикале проводили, используя зрелые семена или семена в стадии молочной спелости. Из стерильных семян вычленили незрелые зародыши, которые помещали на среду культивирования МС, содержащую 2 мг/л 2,4-Д, либо 1 мг/л НУК : 0,5 мг/л 2,4-Д : 0,5 мг/л БАП. Среда индукции морфогенеза содержала 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК.

Содержание хлорофиллов *a* и *b* у бобовых, злаковых и древесных растений определяли в полученной вытяжке пигментов в 96 %-ном этаноле без предварительного их разделения (Wintermans J. F., Demots A., 1965). Оптическую плотность экстракта (E) регистрировали на спектрофотометре Agilent (США). Концентрацию пигментов рассчитывали по уравнениям: С хл. *a* = 13,70 · E₆₆₅ - 5,76 · E₆₄₉; С хл. *b* = 25,80 · E₆₄₉ - 7,60 · E₆₆₅; С *a* + *b* = 6,10 · E₆₆₅ + 20,04 · E₆₄₉.

Экстракцию фракции легкорастворимых белков проводили по методу Сафоновых [14].

Электрофоретическое разделение белков осуществляли в полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной системе с додецилсульфатом Na (SDS) по методу Laemmli [15]. Для линейного электрофореза использовали 5 %-ный концентрирующий и 12 %-ный разделяющий ПААГ. После разделения белковых фракций гели фиксировали 20 % ТХУ, окрашивали 0,1 % Coomassie Blue

R-250, отмывали и фотографировали. Цифровое изображение обрабатывали с использованием компьютерной программы Sigma Gel, представленной фирмой Amersham-Biotech.

Для определения однонитевой ДНК и полидезоксирибонуклеотидов (ПДН) использовали суспензию клеток и ядер [16]. Количество однонитевой ДНК находили методом хроматографии на гидроксипатите (ГАп) [17]. Доля однонитевой ДНК в общем содержании биополимера отражала число разрывов и была выражена в процентах. ПДН экстрагировали на холоде из препаратов клеточных ядер или клеток раствором, содержащим 0,15 М NaCl и 0,7 мМ ЭДТА (рН 7,0). О количестве экстрагированных ПДН судили по их процентной доле в экстракте относительно суммарной ДНК ядер или клеток.

Долю однонитевой ДНК и ПДН определяли и другим методом. Из изолированных клеточных ядер раствором 0,14 М NaCl на 10 мМ Tris-буфере извлекали суммарный экстракт, включающий ДНК различной степени целостности и полинуклеотиды, который тестировали на спектрофотометре (Amersham) против буфера. Затем из экстракта 96 %-ным этанолом осаждали неповрежденную высокополимерную ДНК и спектрофотометрировали (диапазон длины волны 220—350 нм). Считали, что после осаждения ДНК в растворе оставались полидезоксирибонуклеотиды и мононуклеотиды. О количестве экстрагированных ПДН судили по их процентной доле в экстракте относительно суммарного поглощения до осаждения ДНК. Однонитевые разрывы ДНК также способствуют ее фрагментации и экстракции 0,14 М NaCl. Оценку количественного содержания (концентрацию) геномной ДНК определяли по величине поглощения в УФ-свете с длиной волны 260 нм; чистоту образца — по отношению величин поглощения при 260 и 280 нм. Измерения проводили в кварцевых кюветах на спектрофотометре Agilent 8453.

Все анализы проводились в трехкратной повторности. Приведенные в таблицах цифровые данные являются средними из трех повторностей и характеризуют всю выборку. Различия параметров по вариантам принимали как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Экологические факторы по-разному влияют на морфофизиологические и биохимические параметры растений разных систематических групп, которые могут являться индикатором воздействия среды произрастания. Увеличение степени цитогенетического повреждения в клетках и тканях растений считается одним из самых радиочувствительных показателей. Клетки растений можно рассматривать в качестве своеобразных микродозиметров, регистрируя индуцируемые в клетках изменения и повреждения, можно получать достоверную оценку поглощенной дозы [18].

При развитии растений как люпина, так и тритикале на начальных этапах прорастания наблюдали ярко выраженный стимулирующий эффект радиации (рис. 1).

Однако уже на второй неделе проращивания опыт и контроль уравнивались, что подтверждает способность растений к адаптации на активирующее действие малых доз радиации (рис. 2).

Развивающиеся органы, ткани и клетки различных видов растений могут по-разному реагировать на факторы внешней среды и быть индуктором не-



Рис. 1. Проростки тритикале: *а* — контроль, *б* — опыт

благоприятного воздействия. С этой целью проводилось определение морфологической структуры зародышей, их клеток и ядер у представителей семейств злаковых и бобовых растений (тритикале и люпина).

Измерения площади клетки зародыша тритикале (средний показатель) выявили, что клетки зародыша, сформировавшиеся в загрязненной зоне, значительно меньше по размерам (контроль — 740 мкм^2 , опыт — 471 мкм^2). Характерно, что площадь ядра этих клеток показала противоположную картину — ядра облученных растений были значительно крупнее (контроль — $8,54 \text{ мкм}^2$, опыт — $15,88 \text{ мкм}^2$). Соотношение «площадь клетки зародыша тритикале/площадь ядра» у контроля было равным $66,1$, а в опыте — $28,6$. Подобная зависимость наблюдалась и при исследовании представителя семейства бобовых — люпина. Средняя площадь клетки зародыша люпина контрольных растений составила 854 мкм^2 , а опытных — 686 мкм^2 . Соответственно, средняя площадь

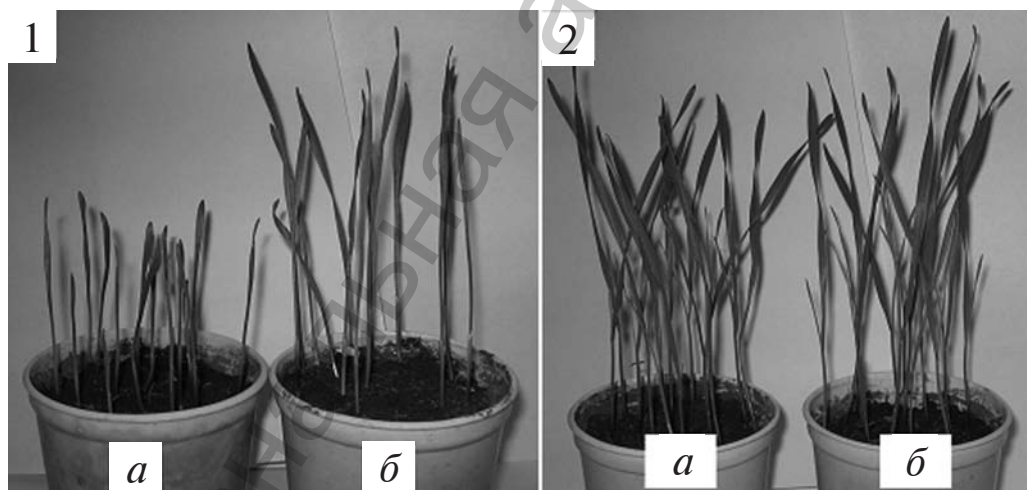


Рис. 2. Растения тритикале: 1 — 7 дней проращивания; 2 — 14 дней проращивания; *а* — контроль, *б* — опыт

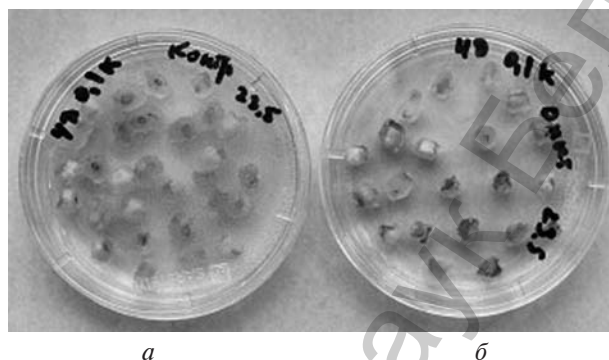


Рис. 3. Развитие каллуса на эксплантах гипокотыля проростков люпина узколистного сорта Першацвет в контрольном (а) и опытном (б) вариантах на среде МС, содержащей 4 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л кинетина, через две недели культивирования

ядра была 11,33 и 14,91 мкм², т. е. соотношение «площадь клетки/площадь ядра» снижалась с 75,3 до 46,0.

Проведенные исследования показали, что соотношение «площадь клетки зародыша/площадь ядра» может стать биоиндикационным показателем внешней среды.

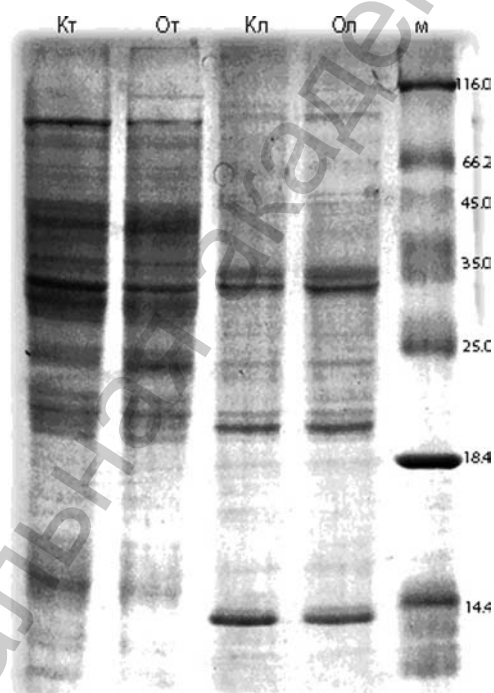


Рис. 4. Электрофоретические спектры экстрактов общих белков из листьев тритикале и люпина опытных и контрольных растений

С целью уменьшения влияния факторов внешней среды были введены в культуру *in vitro* зародыши тритикале и люпина узколистного контрольного и опытного вариантов.

Исследование каллусогенеза на эксплантах гипокотилей люпина узколистного с использованием сред, содержащих 1мг/л 2,4-Д или 4 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л кинетина, показало отличие в реакции ткани контрольного и опытного вариантов: каллусогенная активность ткани опытного варианта была достоверно ниже, чем в контроле (рис. 3). Сходную картину наблюдали и у каллусов тритикале.

Электрофоретический анализ проводили для исследования влияния радиации на белковый состав растений (проростки). Изучали изменение белкового состава (общие белки) у проростков тритикале и люпина. Общее количество полипептидных компонентов на электрофореграммах варьировало от 39 до 43, а молекулярные массы — от 10 до 120 кДа (рис. 4). Установлено,

что под влиянием радиации эти показатели изменяются незначительно. Несмотря на то что люпин является высокобелковой культурой, на электрофоретических треках не обнаружено существенных изменений в количестве зон, однако изменялось их количественное выражение. На электрофореграмме проростков тритикале обнаружены дополнительные полипептиды с Мм 90000, 48000, 18000 кДа. Эти данные свидетельствуют о том, что белоксинтезирующий комплекс растений разных систематических групп специфически отзывается на длительное радиационное воздействие, прежде всего, по уровню экспрессии отдельных белков.

Данные по определению накопления пигментов у представителей злаковых, бобовых и древесных растений показали изменения в содержании хлорофиллов в зависимости от экологических факторов. Наиболее ярко изменения в содержании зеленых пигментов проявились у березы повислой (особенно хлорофилла а) (табл. 1), что позволяет отнести этот объект к ряду биоиндикаторов изучаемого техногенного фактора.

Т а б л и ц а 1. Содержание пигментов в листьях березы повислой (мкг/мл и мкг/мг сырого веса)

Вариант эксперимента	Образец			
	хлорофилл а	хлорофилл б	хлорофилл а+б	хлорофилл а/б
Опыт, мкг/мл	27,88 ± 0,1	14,11 ± 0,1	41,99 ± 0,01	1,98
Контроль, мкг/мл	22,23 ± 0,1	14,49 ± 0,2	36,73 ± 0,02	0,15
Опыт, мкг/мг	2,00 ± 0,01	1,02 ± 0,01	3,021 ± 0,01	0,14
Контроль, мкг/мг	1,83 ± 0,01	1,19 ± 0,02	3,022 ± 0,02	0,01

У растений семейства злаковых (проростки тритикале) отмечено увеличение содержания хлорофилла а в опытных растениях, как и у березы повислой (табл. 2). Показатели содержания пигментов у представителя семейства бобовых (проростков семян люпина), полученные у контрольных и опытных растений, не выявили существенных отличий между контролем и опытом, что, вероятно, объясняется высокой активностью систем репарации у молодых растений (табл. 3).

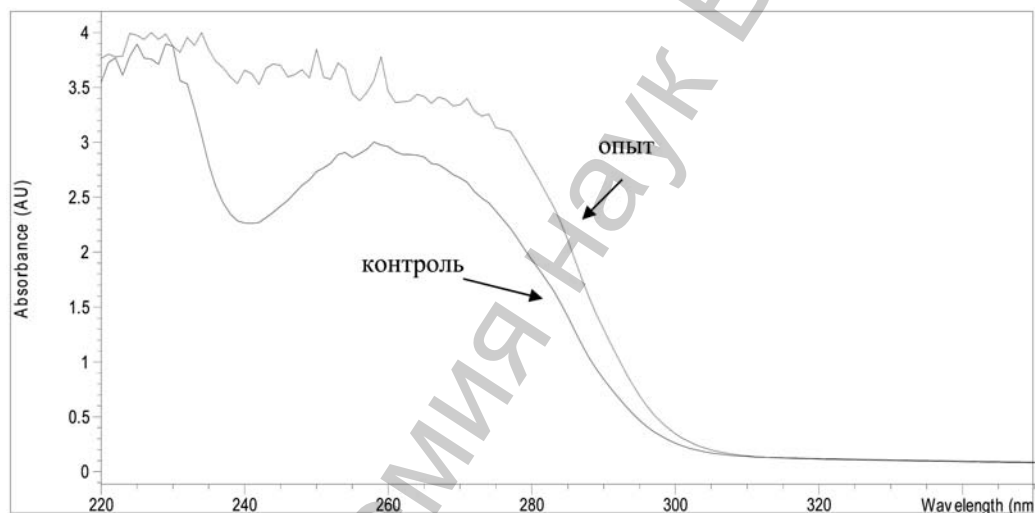
Т а б л и ц а 2. Содержание хлорофиллов а и б в проростках тритикале (мкг/мл и мкг/мг сырого веса)

Вариант эксперимента	Образец			
	хлорофилл а	хлорофилл б	хлорофилл а+б	хлорофилл а/б
Опыт, мкг/мл	26,52 ± 0,2	13,37 ± 0,2	39,89 ± 0,2	1,98
Контроль, мкг/мл	16,06 ± 0,1	10,50 ± 0,1	26,56 ± 0,1	1,53
Опыт, мкг/мг	0,43 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,65 ± 0,02	1,95
Контроль, мкг/мг	0,33 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,45 ± 0,01	2,75

Т а б л и ц а 3. Содержание хлорофиллов а и б в проростках люпина узколистного (мкг/мл и мкг/мг сырого веса)

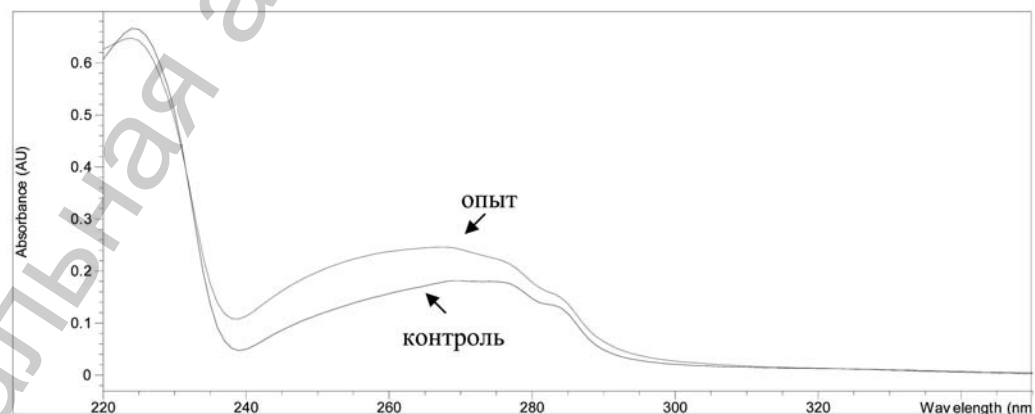
Вариант эксперимента	Образец			
	хлорофилл а	хлорофилл б	хлорофилл а+б	хлорофилл а/б
Опыт, мкг/мл	11,59 ± 0,1	04,32 ± 0,01	15,90 ± 0,2	2,68
Контроль, мкг/мл	11,27 ± 0,1	04,18 ± 0,01	15,45 ± 0,2	2,69
Опыт (семядоли), мкг/мг	0,45 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,62 ± 0,02	2,68
Контроль (семядоли), мкг/мг	0,41 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,56 ± 0,02	2,69

Образец	Фактор разведения	Соотношение длин волн 260/280нм	Длина волны <260 нм>	Длина волны <280 нм>
Контроль	1,00000	1,53510	2,96180	1,92940
Опыт	1,00000	1,25000	3,46350	2,77070



а

Образец	Фактор разведения	Соотношение длин волн 260/280нм	Длина волны <260 нм>	Длина волны <280 нм>
Контроль	1,00000	1,06340	0,15664	0,14730
Опыт	1,00000	1,33230	0,23759	0,17833



б

Рис. 5. Спектры поглощения экстрактов из ядер проростков люпина: а — нуклеиновые кислоты +ПДН; б — высокополимерная ДНК; контроль — растения, выращенные в ЦБС, опыт — растения, выращенные в радиационно-экологическом заповеднике

Степень повреждения ДНК оценивали по процентному содержанию одонитовой ДНК, образующейся при денатурации в щелочных условиях, и по накоплению в клеточных ядрах и цитоплазме растворимых ПДН. Результаты показали снижение количества одонитовой ДНК (на 17,8 %) и экстрагируемых ПДН (на 28,3 %) у проростков тритикале, выращенных из семян, полученных из радиационно-экологического заповедника. Эти данные объясняются резкой активацией систем репарации у представителей семейства злаковых, значительной компактизацией нуклеопротеидного комплекса и изменением взаимодействия ДНК–белок у облученных растений, вследствие чего доступность ДНК для экстракции уменьшается — все эти факторы приводят к повышенным показателям у опытных растений по сравнению с контролем, что аналогично процессам, происходящим при старении клетки.

Продолжение работ по исследованию клеточного ядра на основе определения одонитовых разрывов и растворимых ПДН привело к необходимости отработки более быстрого метода анализа для целей биоиндикации, поскольку существующий метод включает использование колонки с гидроксилпатитом, что очень трудоемко и требует многих повторностей. Указанный метод применили для исследования проростков люпина. Результаты исследований показали увеличение количества экстрагируемых ПДН и ДНК у проростков люпина из семян, полученных из зоны радиационно-экологического заповедника, по сравнению с контролем на 25 % (рис. 5). Этот показатель отличается от таковых у злаковых (тритикале), что мы объясняем активацией систем репарации вследствие облучения у представителей семейства злаковых. У бобовых растений такие реакции слабо выражены, вследствие чего доля ПДН возрастает при облучении, и именно такие виды растений наиболее пригодны для биотестирования.

Результаты дальнейших исследований показали, что, в отличие от ранее полученных данных на проростках (ювенильная стадия развития), зрелые ткани растений как люпина, так и тритикале характеризовались более низким уровнем ПДН и ДНК, чем растения более чистой экологической зоны. Этот эффект связан, по нашим данным, с более прочной связью ДНК–белок в хроматине, общей возрастающей компактизацией хроматина и снижением метаболической активности ядра. Следовательно, на ранних стадиях развития растения разных видов реагируют на радиационное воздействие по-разному. Полученные данные позволят использовать количественное содержание одонитовых разрывов ДНК и ПДН как возможные показатели индуцированных радиацией изменений в хроматине ядер исследуемых объектов.

Заключение. Проведенные исследования подтверждают, что радиоактивное загрязнение влияет на отдельные морфофизиологические и биохимические параметры растений — скорость прорастания семян, размер клеток и ядер, содержание хлорофиллов, экспрессию отдельных полипептидов, что может являться индикатором воздействия среды произрастания.

Опытные растения характеризуются наличием мелких клеток и крупных ядер, что является характерной чертой растений, подвергшихся хроническому облучению, и может служить дополнительным тестом на загрязнение среды радионуклидами.

Исходя из полученных цитолого-морфологических данных можно сделать вывод, что растения, подвергшиеся радиоактивному воздействию, по своим морфологическим показателям отличаются от контроля. Опытные образцы представителей как злаковых, так и бобовых растений характеризовались наличием более мелких клеток и крупных ядер. Количество клеток на единицу массы ткани увеличивалось, а соотношение площадь клетки/площадь ядра у опытных растений была значительно меньше, чем в контроле, что может служить дополнительным тестом на загрязнение среды радионуклидами. Результаты исследований показали снижение количества одонитовой ДНК и экстрагируемых ПДН у проростков тритикале, выращенного в зоне заражения, в то время как в клеточных ядрах люпина наблюдалось увеличение этих показателей, т. е. разные виды растений по-разному реагируют на данный уровень радиационного воздействия. У растений семейства злаковых наблюдалось увеличение содержания хлорофилла *a* в опытных растениях, как и у березы повислой, что в определенной мере позволяет отнести эти объекты к ряду биоиндикаторов данного техногенного фактора. Проанализировав полученные данные можно сделать вывод, что малые дозы радиации могут активировать физиологические процессы растений, что выражается в изменении фотосинтетической активности и интенсивности роста на отдельных этапах онтогенеза. Ответные реакции различных видов растений (особенно далеко отстоящих друг от друга в филогенетическом отношении) на один и тот же режим облучения могут существенно отличаться.

Принимая во внимание тот факт, что адаптогенез к неблагоприятным длительным воздействиям представляет собой общебиологическое явление, проведение исследований по разноуровневой биоиндикации территорий усиленного радиоэкологического контроля сохраняет свою актуальность. Определение показателей и разработка системы биоиндикации территорий с разной степенью радиоэкологической нагрузки позволит более полно определять степень воздействия радиации на геном организмов и проводить мониторинг загрязненных территорий с целью их рационального использования в сельском и лесном хозяйстве.

Авторы выражают благодарность О. П. Булко за предоставленные данные по морфологии растительной клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б07К-103).

Литература

1. Б а н д а р е н к а Э. У., Л я ў к о ў І. А., П а л я к ш а н а в а Г. У. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 1994. № 3. С. 37–42.
2. М и р о н е н к о А. В. Биохимия люпина. Минск, 1975. — 311 с.
3. Т и ш к е в и ч Т. К. // Биология. 1993. Т. 33, № 1. С. 54–57.
4. Г р о д з и н с к и й Д. М. Радиобиология растений. Киев, 1989. — 384 с.
5. К о м а р В. Е., Х а н с о н Л. П. Информационные макромолекулы при лучевом поражении клеток. М., 1980. — 175 с.
6. М о с к а л е в а Е. Ю., И л ю ш и н а Н. А. // Итоги науки и техники. Сер. радиац. биология. 1990. Т. 9. С. 3–113.

7. Сынзыныс В. И., Саенко А. С., Пелевина И. И. // Итоги науки и техники. Сер. радиац. биология. 1990. Т. 9. С. 114—213.
8. Гудков И. Н. Основы общей и сельскохозяйственной радиобиологии. Киев, 1991. — 328 с.
9. Hagen V. // Biophys. 1990. Vol. 29, N 4. P. 315—322.
10. Datta N. // Plant Physiol. 1987. Vol. 84. P. 1397—1401.
11. Dianov G. L., Parsons J. L. // DNA Repair (Amst). 2007. Vol. 6, N 4. P. 454—460.
12. Datta N., Scheil M. B., Roux S. J. // Plant Physiol. 1987. Vol. 84. P. 1397—1401.
13. Murashige T. // Physiol Plant. 1962. Vol. 15. P. 473—497.
14. Сафонов В. И. // Биохимические методы в физиологии растений: Сб. ст. / Под ред. Ю. Г. Молотковского. М., 1971. С. 113—119.
15. Lemli U. K. // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680—685.
16. Абрамов В., Сергеева С. А., Птицына С. Н. и др. // Генетика. 1992. Т. 28, № 6. С. 69—73.
17. Гриних Л. И., Шевченко В. В. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1994. Т. 34, вып. 4—5. С. 620—625.
18. Гудков И. Н. // Навук. вісн. Чернівецького ун-ту. 2008. Вып. 417: Биология. С. 361—368.

V. O. CHYZHYK, M. K. MALJUSH

CYTOMORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PLANTS, GROWING ON THE HIGHER LEVEL OF RADIOECOLOGICAL PRESSURE TERRITORIES

Summary

It was confirmed that in plant genome of different systematic groups, growing in radio-ecological reservation, the changes, dealing with partly not repaired DNA damages and redistribution of its parts, bounded with proteins, changes of cells and nuclei size, changes of pigment system functioning and assimilation apparatus are taking place. Express method of PDN definition in the cell nuclei was elaborated. Radiation differently influences on morphophysiological and biochemical parameters of plants of different systematic groups and ages, which can be the indicator of environment influence.

УДК 582.71:577.1

А. В. БАШИЛОВ

**ВЛИЯНИЕ ЛИПОПЕРЕКИСЕЙ НА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ
СВОЙСТВА ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 11.02.2009)

*Установлено, что экстрактивные вещества листьев, соцветий, корней и корневищ *Filipendula hexapetala* Gilib. оказывают ингибирующее действие на перекисное окисление масла льна. Полученные экстракты можно рекомендовать как ингибиторы перекисидации масла льна для пролонгации срока его хранения.*

Введение. В современных концепциях питания все большее внимание уделяется минорным компонентам пищи, во многом определяющим ее профилактическое и лечебное действие. Одними из самых представительных микронутриентов являются биоантиоксиданты (АО), снижающие активность радикальных окислительных процессов [1].

Наряду с синтетическими АО в условиях современной пищевой и фармацевтической промышленности имеется множество соединений растительного происхождения с АО-свойствами. Некоторые из них, например аскорбиновая кислота, эффективно используются как пищевые добавки при производстве и хранении продуктов питания, предохраняя их от перекисного окисления [2]. Огромное количество публикаций технологической и биохимической направленности посвящено проблеме перекисного окисления липидов в пищевых продуктах и ингибированию этого процесса природными АО. Широкую группу пищевых фенольных АО составляют флавоноиды. Они действуют как первичные АО, хелаторы и ловушки супероксид-аниона [3].

АО пищи в значительной степени определяют эффективность функционирования сложноорганизованной системы АО-защиты организма от избыточного свободно-радикального перекисного окисления. Недостаточная обеспеченность продуктов питания АО может рассматриваться как фактор риска развития свободно-радикальных патологий, проявляющихся многими заболеваниями и клиническими синдромами [4–6]. Одним из наиболее доступных способов повышения обеспеченности организма человека микронутриентами АО-свойства является использование растительного сырья [7; 8].

К группе таких растений, произрастающих на территории Республики Беларусь, можно отнести лабазник шестилепестный (*Filipendula hexapetala* Gilib.):

растение характеризуется широким спектром фармакологического действия, а также высоким содержанием АО [9].

Цель работы — изучить влияние флавоноидсодержащих экстрактивных веществ, полученных из соцветий, листьев, корней и корневищ *Filipendula hexapetala* Gilib., на интенсивность процессов перекисного окисления липидов пищевого масла льна с последующей возможностью применения изученных экстрактов в качестве безопасных ингибиторов процессов перекисидации льняного масла.

Материалы и методы исследований. Объекты исследования: воздушно-сухое растительное сырье *Filipendula hexapetala* Gilib. (соцветия, листья, корни и корневища) и пищевое масло льна.

Для получения флавоноидсодержащих экстрактов в колбу объемом 150 мл помещали 1 г растительного сырья и прибавляли 30 мл 90 %-го этилового спирта, содержащего 1 % концентрированной хлористоводородной кислоты, после чего колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин (экстракцию проводили трижды). Полученные экстракты охлаждали до комнатной температуры и фильтровали в мерную колбу с последующим удалением этанола на роторном испарителе до получения сухого остатка [10].

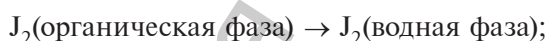
Основную роль в перекисидации ненасыщенных жирных кислот играет образование гидроперекисей как ключевых продуктов, обуславливающих цепной механизм перекисного окисления. Наличие гидроперекисей в маслах характеризуется таким показателем, как перекисное число (ПЧ).

Методика определения ПЧ относится к так называемым методам заместительного титрования. В основе метода лежат следующие процессы:

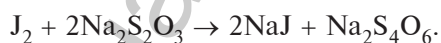
1) гомогенное окисление йодида калия гидроперекисями с образованием вторичных спиртов и выделением молекулярного йода:



2) экстракция выделяющегося йода в водную фазу:

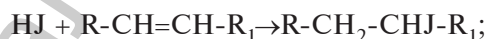


3) гомогенное восстановление йода тиосульфатом натрия в водной фазе:

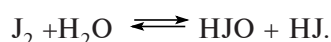


Многокомпонентность такой системы обуславливает возможность протекания ряда побочных реакций:

1) присоединение йодоводорода по двойным связям ненасыщенных жирных кислот:



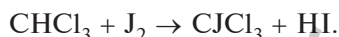
2) диспропорционирование йода:



Реакция диспропорционирования обратима, однако присоединение йодида водорода по двойным связям сдвигает равновесие в сторону прямой реакции.

Также нужно отметить, что гипойодит-анион более слабый окислитель, чем йод, поэтому диспропорционирование йода почти неизбежно приводит также к смещению равновесия реакции титрования тиосульфатом натрия влево и ее торможению;

3) реакции замещения в органической фазе:



Все побочные реакции протекают в очень малой степени и незначимы для измерения ПЧ.

Эксперименты проводили по доработанной методике А. О. Здоровениной [11], регламентированной Государственной фармакопеей Республики Беларусь, в уксусно-хлороформной среде при температуре 18–20 °С [12]. В конической колбе емкостью 200 мл отвешивали 2 г масла льна. Навеску растворяли в 20 мл смеси ледяной уксусной кислоты и хлороформа (2 : 1 по объему), прибавляли 5 мл 50 %-го раствора йодида калия, сосуд закрывали пробкой и ставили в темное место на 35 мин, после чего доливали 50 мл дистиллированной воды и оттитровывали выделившийся йод 0,002 н. раствором тиосульфата натрия (индикатор — крахмал). Одновременно проводили также контрольное титрование (без масла).

Значение ПЧ (количество миллиграммов йода, выделенное гидроперекисями, содержащимися в 100 г масла) рассчитывали по уравнению

$$\text{ПЧ} = (V_k - V_0) k 0,0002538 \cdot 100/m,$$

где V_k — объем 0,002 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованный при контрольном определении, мл; V_0 — объем 0,002 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованный при титровании опытного образца, мл; k — поправочный коэффициент раствора тиосульфата натрия; 0,02538 — титр 0,002 н. раствора тиосульфата натрия по йоду (1 мл раствора соответствует 0,0002538 г йода); m — навеска масла льна, г.

Оценку антиоксидантной активности (АОА) экстрактов *Filipendula hexapetala* Gilib. проводили на модельной системе (в течение 200 сут.), включающей генерацию продуктов перекисного окисления липидов масла льна и систему их детектирования. Введение в систему ингибиторов перекисного окисления (в нашем случае флавоноидсодержащие экстракты, 0,2 % в пересчете на кверцетин) вызывало изменение концентрации продуктов перекисации, что отражалось на физико-химических параметрах детектируемой системы.

АОА экстрактов регистрировали по уменьшению скорости образования липоперекисей в масле льна и увеличению периода индукции автоокисления по сравнению со стандартом АОА — кверцетином и контролем — льняное масло.

Все анализы проводили в четырехкратной повторности, полученные результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 (данные считали достоверными при $p < 0,05$).

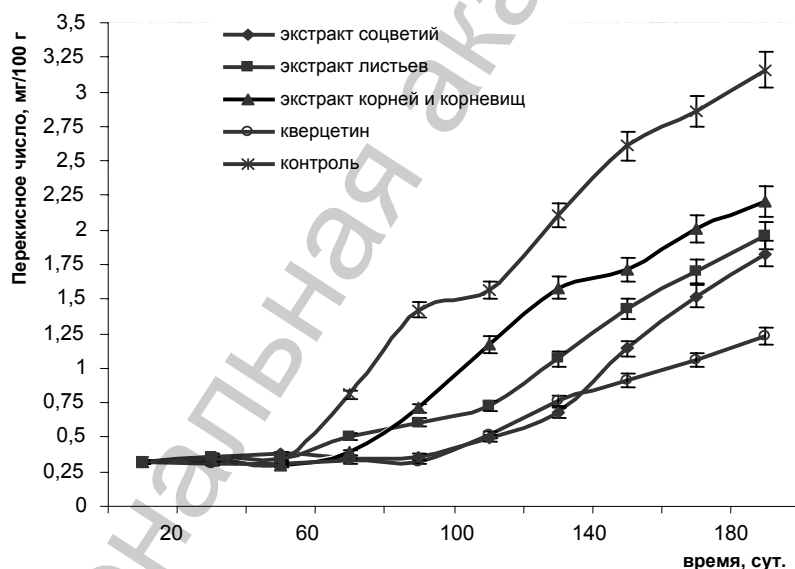
Результаты и их обсуждение. Кинетика перекисного окисления масла льна представлена на рисунке. Период индукции перекисации в среднем составил 50 сут., что вдвое короче стандарта АОА — кверцетина. После 50-суточной

инкубации скорость образования липоперекисей увеличилась и составила $1,42 \pm 0,05$ мг/100 г. Начиная с 90-х сут. экспозиции, кривая окисления вышла на плато, параллельно оси абсцисс, среднее значение уровня перекисидации составило $1,49 \pm 0,07$ мг/100 г.

На 110-е сут. инкубации *in vitro* регистрировали скачок уровня окисления масла льна, что подтверждают данные значения ПЧ. Так, в точке, соответствующей 110 сут., уровень перекисидации составил $1,56 \pm 0,06$ мг/100 г, тогда как в точке, адекватной 200-м сут., он достиг $3,16$ мг/100 г.

Кинетика перекисидации *in vitro* при добавлении кверцетина (0,2 %) заметно отличалась от динамики окисления масла льна (рисунок). Индукционный период ингибирования окисления регистрировали в течение 70 сут., среднее значение ПЧ составило $0,32 \pm 0,02$ мг/100 г. По сравнению с контролем, кверцетин увеличил время индукции окисления на 44,4 %. Начиная с 90-х сут., регистрировали постепенное увеличение ПЧ. В точке «110 сут.» значение ПЧ составило $0,52 \pm 0,02$ мг/100 г. Увеличение времени инкубации модельной системы до 200 сут. вызвало накопление продуктов перекисидации, уровень которых в пересчете на ПЧ составил $1,23 \pm 0,03$ мг/100 г.

Результаты исследований АОА флавоноидсодержащего экстракта соцветий *Filipendula hexapetala* Gilib. представлены на рисунке. Индукционный период ингибирования перекисидации составил 90 сут. и схож с аналогичным периодом, протекающим при добавлении кверцетина. Значение ПЧ в начальной фазе достигло $0,35 \pm 0,02$ мг/100 г, что на 45,5 % выше по сравнению с контролем. Увеличение времени экспозиции до 130 сут. вызвало повышение накопления липоперекисей до $0,68 \pm 0,05$ мг/100 г, что ниже по сравнению с кверцетином на 8,6 %. В точке экспозиции, соответствующей 140-м сут., происходило



Кинетика ингибирования перекисидации масла льна экстрактами *Filipendula hexapetala* Gilib.

наложение координат пероксидации, протекающей в условиях кверцетина и экстракта с последующим ростом содержания липоперекисей в среде инкубации. Затем АОА *in vitro* снижалась, что не могло не сказаться на концентрации продуктов пероксидации. В точке «50 сут.» ПЧ составило $1,14 \pm 0,11$ мг/100 г, а в конечной точке инкубации (200 сут.) — $1,83 \pm 0,11$ мг/100 г, что на 32,7 % выше по сравнению с кверцетином.

Кинетика ингибирования перекисного окисления масла льна экстрактивными веществами листьев *Filipendula hexapetala* Gilib. свидетельствует об аналогии результатов, полученных в контрольном и стандартном вариантах (рисунок). Начиная с точки «50 сут.», регистрировали накопление липоперекисей. На 70-е сут. уровень продуктов пероксидации достиг $0,50 \pm 0,03$ мг/100 г в пересчете на ПЧ.

При пролонгации времени экспозиции до 110 сут. наблюдалось повышение интенсивности накопления продуктов пероксидации *in vitro*. В точке титрования, соответствующей 130 сут., ПЧ составило $1,07 \pm 0,05$ мг/100 г, а в конечной точке «200 сут.» — $1,96 \pm 0,11$ мг/100 г, что на 37,2 % выше, чем в варианте с кверцетином и на 37,9 % ниже процессов пероксидации в контрольном образце. Основываясь на полученных выше результатах, можно заключить, что экстрактивные вещества листьев *Filipendula hexapetala* Gilib. уступают по АОА соцветиям (рисунок).

Индукционный период ингибирования перекисного окисления липидов экстрактом корней и корневищ *Filipendula hexapetala* Gilib. (рисунок) регистрировали в течение первых 50 сут. Среднее значение ПЧ для данного периода составило $0,31 \pm 0,02$ мг/100 г. Увеличение времени инкубации вызвало снижение АОА экстракта, что отразилось на уровне пероксидации. В точке «70 сут.» значение ПЧ достигало $0,39 \pm 0,03$ мг/100 г, что на 15,4 % выше по сравнению с опытами, использующими кверцетин, и на 51,8 % ниже контроля.

Начиная с 70 сут., регистрировали повышение содержания липоперекисей *in vitro*. В точке титрования «110 сут.» детектировали уровень пероксидации жирных кислот, равный $1,17 \pm 0,07$ мг/100 г в пересчете на ПЧ. Максимум пероксидации соответствовал точке «130 сут.», где он составил $1,58 \pm 0,09$ мг/100 г, что на 51,9 % выше по сравнению с АО — кверцетином и на 25,1 % ниже контроля.

При дальнейшем увеличении времени инкубации модельной системы наблюдали затухание процессов пероксидации, среднее значение которых фиксировалось на уровне $1,64 \pm 0,07$ мг/100 г в пересчете на ПЧ. Затем регистрировали вторичное повышение уровня пероксидации и в конечной точке титрования (200 сут.) ПЧ составило $2,21 \pm 0,11$ мг/100 г.

Выводы. Экстрактивные вещества, полученные из воздушно-сухого растительного сырья соцветий, листьев, корней и корневищ *Filipendula hexapetala* Gilib., оказывают существенное ингибирующее действие на процессы перекисного окисления пищевого масла льна.

На основании данных о количественных значениях ПЧ в конечной точке детектирования (200 сут.) растительные образцы можно расположить в порядке последовательного возрастания АОА следующим образом: корни и корневища < листья < соцветия *Filipendula hexapetala* Gilib. Изученные экстракты

могут быть рекомендованы в качестве АО, обеспечивающих продление сроков годности пищевого масла льна и продуктов на его основе.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б08М-004).

Литература

1. Меньшикова Е. Б., Зенков Н. К. // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113, № 4. С. 442.
2. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K. Food Antioxidants. Marcel Dekker, 1996. — 490 p.
3. Machlin L. J., Bendich A. // Faseb J. 1987. N 48. P. 441.
4. Биленко М. В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. М., 1989. — 368 с.
5. Бобырев В. Н. // Пат. физиол. 1989. № 5. С. 90.
6. Гусев В. А., Панченко Л. Ф. // Нейрохимия. 1997. Т. 14, № 1. С. 3.
7. Тутельян В. А. // Вопр. питания. 1996. № 6. С. 3.
8. Hill K. E., Burk R. F. // Biomed. Environ. Sci. 1997. N 2—3. P. 198.
9. Башилов А. В., Решетников В. Н. // Мат. междунар. науч.-практ. конф. (Нарочанские чтения). 2006. С. 4—12.
10. Косман В. М., Зенкевич И. Г. // Растительные ресурсы. 2001. Т. 37, вып. 4. С. 123—129.
11. Здоровенина А. О., Фридман И. А. // Масложировая промышленность. 2006. № 2. С. 22—24.
12. Годовальников Г. В. Государственная фармакопея Республики Беларусь. Общие методы контроля качества лекарственных средств. Минск, 2006. С. 127—129.

A. V. BASHILOV

INFLUENCE OF LIPOPEROXIDS ON ANTIOXIDIZING PROPERTIES OF FLAVONOID-CONTAINING EXTRACTS

Summary

It is established that extractal substances of leaves, inflorescences, roots and rhizomes of *Filipendula hexapetala* Gilib. render inhibitorical action on peroxidical oxidation of linseed oil. The received extracts can be recommended as inhibitors of peroxidical oxidations of linseed oil with the purpose of prolongation of its period of storage.

УДК 546.287

В. В. КОВАЛЕНКО, О. О. ЛОМАКОВА, Н. П. ЕРЧАК

**РОСТРЕГУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРООКСАЛАТОВ
МЕТИЛБИС(ФЕНИЛМЕТИЛ)- γ -АМИНОПРОПИЛСИЛАНОВ**

Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина

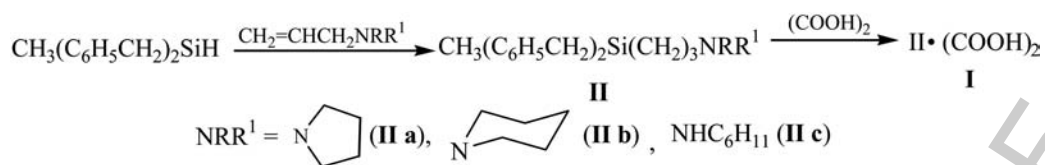
(Поступила в редакцию 08.06.2009)

*Синтезировано новое растворимое в воде кремнийорганическое соединение — гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(*N*-циклогексил)аминопропилсилана. На культуре редиса и люпина изучена рострегулирующая активность синтезированного гидрооксалата, а также ранее описанных авторами аналогов — гидрооксалатов метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана и метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана. Определены концентрации растворов гидрооксалатов, проявляющие как стимулирующий, так и ингибирующий эффект в отношении энергии прорастания, всхожести и общего прироста длины зародышевых корешков прорастающих семян.*

Введение. Кремнийорганические соединения представляют значительный интерес как потенциальные регуляторы роста растений [1]. На основе пятикоординированных соединений кремния, силатранов, уже созданы регуляторы роста растений [2]. Однако соединения этого класса веществ имеют существенные недостатки: они быстро гидролизуются, а мивал в своем составе содержит хлор, что представляет потенциальную угрозу для окружающей среды.

С целью получения экологически безопасных регуляторов роста растений нового поколения нами были синтезированы новые растворимые в воде кремнийорганические соединения — гидрооксалаты γ -аминопропилсиланов. Рострегулирующая активность некоторых соединений данного типа исследована ранее [3—6].

Материалы и методы исследования. Гидрооксалаты метилбис(фенилметил)- γ -аминопропилсиланов (I) получены в результате взаимодействия эквимольных количеств γ -аминопропилсиланов (II) с щавелевой кислотой в органическом растворителе при комнатной температуре. Исходные аminosилановые производные синтезированы по реакции гидросилилирования соответствующих ненасыщенных аминов без растворителя в присутствии каталитических количеств 0,1 М раствора гексахлороплатината (IV) водорода в тетрагидрофуране (ТГФ).



Хромато-масс-спектрометрическое исследование выполнено на приборе Shimadzu GC-17A с квадрупольным детектором QP 5050A. Спектры ЯМР зарегистрированы при 25 °С (400 МГц) на спектрометре Varian MERCURY-plus. Внутренний стандарт ТМС.

Синтез метилбис(фенилметил)-γ-(N-циклогексиламино)пропилсилана (II c). К 5,65 г метилбис(фенилметил)силана прибавляли 3,48 г аллилциклогексиламина и каталитическое количество 0,1 М раствора $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в ТГФ. Реакционную смесь запаивали в стеклянную ампулу и нагревали по схеме: 120 °С (2 ч), 140 °С (2 ч), 160 °С (2 ч), 180 °С (40 ч). Перегонкой выделили 7,12 г продукта (78 %) с т. кип. 196 °С (1,5 мм рт. ст.), n_D^{20} 1,5490. Масс-спектр, m/z (I относит., %): 365(0,6); 322 (1,0); 274 (58,4); 225 (3,9); 192 (7,4); 182 (1,9); 145 (5,8); 135 (5,1); 133 (7,4); 119 (5,4); 112 (100); 100 (7,4); 91 (10,1); 65 (3,5); 55 (47).

Синтез гидрооксалата метилбис(фенилметил)-γ-(N-циклогексиламино)пропилсилана (I c). К 0,85 г (9,44 ммоль) щавелевой кислоты в 10 мл ТГФ при интенсивном перемешивании прибавляли 3,45 г (9,44 ммоль) метилбис(фенилметил)-γ-(N-циклогексиламино)пропилсилана в 10 мл диэтилового эфира. Выпавший осадок отфильтровывали на фильтре Шотта, промывали ТГФ, диэтиловым эфиром, сушили в вакууме водоструйного, а затем масляного насоса при комнатной температуре. Выход продукта реакции 4,0 г (93 %). Температура плавления 143 °С. Найдено, %: С 68,53; Н 8,18; N 3,07. $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_4\text{Si}$. Вычислено, %: С 68,68; Н 8,02; N 3,26. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: -0,15 (s, 3H, CH_3); 0,39—0,43 (m, 2H, SiCH_2); 1,05—1,09 (m, H, H^4 акс. циклогексанового кольца); 1,18—1,26 (m, 2H, CCH_2C); 1,18—1,26 (m, 2H, H^3 акс., H^5 акс. циклогексанового кольца); 1,52—1,59 (m, 2H, H^2 акс., H^6 акс. циклогексанового кольца); 1,52—1,59 (m, H, H^4 экв. циклогексанового кольца); 1,71—1,73 (m, 2H, H^3 экв., H^5 экв. циклогексанового кольца); 1,93—1,96 (m, 2H, H^2 экв., H^6 экв. циклогексанового кольца); 2,08 (s, 4H, CH_2SiCH_2); 2,72—2,76 (m, 2H, NCH_2); 2,83—2,87 (m, H, H^1 акс. циклогексанового кольца); 6,97—7,02 (m, 4H, α -H фенильного заместителя); 7,04—7,06 (m, 2H, γ -H фенильного заместителя); 7,17—7,21 (m, 4H, β -H фенильного заместителя); 7,60—8,80 (m, 2H, COOH). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ , м. д.: -5,30 (SiCH_3); 9,85 (SiCH_2); 20,47; 23,23; 24,41; 25,23; 28,95; 46,79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NC}_6\text{H}_{11}$); 55,95 (ArCH_2); 124,52; 128,48; 128,69; 139,76 (C_6H_5); 165,17 (COOH). Спектр ЯМР ^{29}Si (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 2,47.

Синтез метилбис(фенилметил)-γ-пирролидинопропилсилана (II a) и его гидрооксалата (I a) описан в работе [7].

Синтез метилбис(фенилметил)-γ-пиперидинопропилсилана (II b) и его гидрооксалата (I b) описан в работе [8].

Исследования рострегулирующей активности проводились на культуре редиса и люпина. Было изучено влияние различных концентраций (0,001; 0,0001; 0,00001 и 0,000001 моль/л) гидрооксалатов γ -аминопропилсиланов. Опыты

проводились в четырехкратной повторности по 100 шт. семян редиса и по 50 шт. семян люпина в каждой. Условием воздействия являлось замачивание семян в растворах изучаемых веществ. Время экспозиции — 1 час. В качестве контроля использовались растения, полученные из семян, которые замачивались в дистиллированной воде без исследуемых веществ. Проращивание осуществлялось в растильнях между слоями фильтровальной бумаги при постоянной температуре воздуха в темноте (в термостате).

Биологическая активность оценивалась по следующим морфобиологическим критериям роста и развития растений: энергия прорастания семян — способность семян быстро и одновременно прорасти (определяется как процент нормально проросших семян за определенное время); лабораторная всхожесть — способность семян образовывать нормально развитые проростки (определяется как отношение нормально проросших семян к общему числу семян, взятых для проращивания); общий прирост длины зародышевых корешков прорастающих семян [9; 10]. Влияние растворов исследуемых веществ на эти показатели изучалось путем фенологических наблюдений и биометрических измерений. Статистическая обработка велась по Рокицкому [11]. Определялись средние значения результатов определения энергии прорастания, всхожести семян и длины зародышевых корешков, стандартное отклонение, ошибка среднего арифметического. Точность отличий между данными контроля и опыта определялась на основе критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Показатель энергии прорастания очень часто используется в качестве тестового для выявления возможной биологической активности новых химических соединений.

Результаты проведенных наблюдений отражены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Влияние растворов изучаемых соединений на показатель энергии прорастания семян редиса

Вариант эксперимента	Энергия прорастания, %	
	Показатель	Отклонение от контроля
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана		
Контроль	93	—
0,0001 М	94	+ 1
0,00001 М	93	—
0,000001 М	100	+ 7
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана		
Контроль	92	—
0,001 М	98	+ 6
0,0001 М	92	—
0,00001 М	99	+ 7
0,000001 М	97	+ 5
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана		
Контроль	99	—
0,001 М	100	+ 1
0,0001 М	95	— 4
0,00001 М	100	+ 1
0,000001 М	95	— 4

Как показывают данные, приведенные в табл. 1, растворы гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана не оказали на энергию прорастания значительного влияния по сравнению с контролем. Положительно воздействовал на прорастание семян редиса только наименее концентрированный раствор (0,000001 М), энергия прорастания в этом варианте достоверно увеличивалась по сравнению с контролем на 7 %. Энергия прорастания семян редиса, обработанных растворами гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана, статистически достоверно увеличилась по сравнению с контролем. Раствор с концентрацией 0,0001 М не оказал стимулирующего действия на энергию прорастания, показатель имеет значение, одинаковое с контролем. Проведенные исследования показали неоднозначное влияние растворов гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана на энергию прорастания, в концентрациях 0,001 и 0,00001 М повышали, а в концентрациях 0,0001 и 0,000001 М статистически достоверно понижали этот показатель.

В результате исследований по изучению влияния растворов исследуемых соединений на всхожесть семян редиса были получены данные, которые отражены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Влияние растворов исследуемых соединений на показатель всхожести семян редиса

Вариант эксперимента	Всхожесть, %	
	Показатель	Отклонение от контроля
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана		
Контроль	95	–
0,0001 М	95	–
0,00001 М	98	+ 3
0,000001 М	100	+ 5
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана		
Контроль	94	–
0,001 М	100	+ 6
0,0001 М	100	+ 6
0,00001 М	97	+ 3
0,000001 М	99	+ 5
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана		
Контроль	98	–
0,001 М	92	– 6
0,0001 М	97	– 1
0,00001 М	97	– 1
0,000001 М	98	–

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что влияние растворов гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана на семена редиса проявлялось в статистически достоверном повышении их всхожести. При этом стимулирующий эффект увеличивался с уменьшением концентрации растворов. Растворы всех опытных концентраций гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана положительно влияли на всхожесть семян редиса. Значительного влияния растворы гидрооксалата

метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана на всхожесть семян редиса не оказывали. Только наиболее концентрированный раствор 0,001 М снижал этот показатель на 6 % по сравнению с контролем.

Анализ полученных данных о влиянии растворов гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана на длину зародышевых корешков семян редиса, представленных в табл. 3, показывает, что наименее концентрированный раствор оказывал статистически достоверное ингибирующее воздействие. Показатели остальных концентраций существенно не отличались от контроля.

Обработка семян растворами гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана приводила к достоверному снижению прироста корешков редиса. При этом ингибирующий эффект возрастал по мере увеличения концентрации растворов гидрооксалата (табл. 3).

Растворы гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана во всех вариантах эксперимента вызывают статистически достоверное понижение роста зародышевых корешков по сравнению с контролем. Наибольшее ингибирующее влияние оказал самый концентрированный раствор, прирост длины корешков в этом варианте эксперимента оказался ниже контроля более чем в два раза (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Длина зародышевых корешков семян редиса, обработанных растворами исследуемых соединений ($t = 144$ ч)

Длина $x \pm m$, мм				
Контроль	0,001 М	0,0001 М	0,00001 М	0,000001 М
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана				
84,28 \pm 3,82	—	84,67 \pm 4,07	88,67 \pm 4,04	72,58* \pm 3,84
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана				
87,98 \pm 5,26	60,06** \pm 2,68	69,06** \pm 3,27	72,14* \pm 3,08	78,32 \pm 3,18
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана				
96,61 \pm 3,90	43,77** \pm 2,63	54,18** \pm 3,34	75,47** \pm 4,23	77,46** \pm 4,45

П р и м е ч а н и я: * — при уровне значимости $p < 0,05$; ** — при уровне значимости $p < 0,01$.

Данные эксперимента по изучению влияния растворов исследуемых соединений на энергию прорастания семян люпина отражены в табл. 4.

Анализ данных, приведенных в табл. 4, дает основание говорить о незначительном увеличении энергии прорастания семян люпина под воздействием 0,0001 и 0,00001 М растворов гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана. Наименее концентрированный раствор (0,000001 М) снижает этот показатель по сравнению с контролем на 5 %.

Довольно интересные данные были получены при исследовании влияния водных растворов гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана на энергию прорастания семян люпина. В случае наибольшей и наименьшей опытной концентрации этот показатель увеличивался на 1 и 2 % соответственно. Растворы с промежуточными значениями концен-

Т а б л и ц а 4. Влияние растворов исследуемых соединений на показатель энергии прорастания семян люпина

Вариант эксперимента	Энергия прорастания, %	
	Показатель	Отклонение от контроля
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана		
Контроль	95	–
0,0001 М	97	+ 2
0,00001 М	96	+ 1
0,000001 М	90	– 5
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана		
Контроль	98	–
0,001 М	99	+ 1
0,0001 М	92	– 6
0,00001 М	93	– 5
0,000001 М	100	+ 2
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана		
Контроль	97	–
0,001 М	98	+ 1
0,0001 М	98	+ 1
0,00001 М	100	+ 3
0,000001 М	95	– 2

трации (0,0001 и 0,00001 моль/л) статистически достоверно понижали этот показатель (по сравнению с контролем на 6 и 5 % соответственно).

Опытные растворы гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана оказывают стимулирующее влияние на энергию прорастания семян люпина. Только наиболее разбавленный раствор данного соединения (0,000001 М) понижает этот показатель на 2 %. В случае опытного раствора с концентрацией 0,00001 моль/л энергия прорастания семян люпина статистически достоверно повышается по сравнению с контролем на 3 %.

Результаты изучения всхожести семян люпина под влиянием различных концентраций синтезированных гидрооксалатов представлены в табл. 5.

Т а б л и ц а 5. Влияние растворов исследуемых соединений на показатель всхожести семян люпина

Вариант эксперимента	Всхожесть, %	
	Показатель	Отклонение от контроля
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана		
Контроль	95	–
0,0001 М	98	+ 3
0,00001 М	96	+ 1
0,000001 М	91	– 4
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана		
Контроль	95	–
0,001 М	98	+ 3
0,0001 М	95	–
0,00001 М	96	+ 1
0,000001 М	100	+ 5

Окончание табл. 5

Вариант эксперимента	Всхожесть, %	
	Показатель	Отклонение от контроля
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана		
Контроль	96	—
0,001 М	97	+ 1
0,0001 М	96	—
0,00001 М	100	+ 4
0,000001 М	97	+ 1

Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана в концентрациях 0,0001 и 0,00001 М повышает всхожесть семян люпина на 3 и 1 % соответственно, а в концентрации 0,000001 моль/л уменьшает на 4 % (табл. 5). Наметившаяся тенденция по влиянию гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана на показатель энергии прорастания семян сохранилась и при изучении влияния на показатель всхожести семян люпина. Наибольших значений всхожесть достигла в опытных вариантах с самым концентрированным и самым разбавленным раствором данного соединения. Наиболее эффективным раствором гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана, обеспечивающим уровень всхожести семян люпина 100 %, является раствор с концентрацией 0,00001 М.

Изучение влияния растворов гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана на прирост зародышевых корешков семян люпина показало, что они не оказывают значимого влияния на данный показатель (табл. 6).

Опытные растворы гидрооксалата метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана благоприятно воздействуют на рост зародышевых корешков люпина. Как видно из данных табл. 6, наблюдается достоверное опережение по сравнению с контролем роста корешков семян, обработанных 0,00001 и 0,000001 М растворами.

Обработка семян 0,00001 М раствором метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана достоверно снижала прирост корешков люпина, осталь-

Т а б л и ц а 6. Длина зародышевых корешков семян люпина, обработанных растворами исследуемых соединений ($t = 168$ ч)

Длина $x \pm m$, мм				
Контроль	0,001 М	0,0001 М	0,00001 М	0,000001 М
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана				
53,24 \pm 2,03	—	56,50 \pm 1,85	50,70 \pm 1,99	47,04 \pm 1,91
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана				
51,40 \pm 2,28	48,26 \pm 1,74	53,43 \pm 2,19	63,76* \pm 2,57	59,27* \pm 2,16
Гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана				
58,00 \pm 1,99	62,90 \pm 2,69	51,38** \pm 2,54	59,62 \pm 2,33	54,16 \pm 2,11

П р и м е ч а н и я: * — при уровне значимости $p < 0,01$; ** — при уровне значимости $p < 0,05$.

ные концентрации этого вещества не оказывали на данный показатель значимого влияния (табл. 6).

Выводы. 1. Синтезировано новое растворимое в воде кремнийорганическое соединение — гидрооксалат метилбис(фенилметил)- γ -(N-циклогексил)аминопропилсилана.

2. На культуре редиса и люпина изучена рострегулирующая активность синтезированного гидрооксалата, а также ранее описанных авторами аналогов — гидрооксалатов метилбис(фенилметил)- γ -пиперидинопропилсилана и метилбис(фенилметил)- γ -пирролидинопропилсилана.

3. Определены концентрации растворов гидрооксалатов, проявляющие как стимулирующий, так и ингибирующий эффект в отношении энергии прорастания, всхожести и общего прироста длины зародышевых корешков прорастающих семян.

Авторы благодарят профессора Э. Лиепиньша и магистра К. Пыповского за ЯМР и хромато-масс-спектрометрический анализ соединений.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № X08M-198).

Литература

1. Воронков М. Г., Зелчан Г. И., Лукевиц Э. Я. Кремний и жизнь. Биохимия, фармакология и токсикология соединений кремния. Рига, 1978. — 587 с.
2. Воронков М. Г., Кузнецов И. Г., Дьяков В. М. Новый биостимулятор — мивал в сельском хозяйстве. М., 1982. — 167 с.
3. Ламакова В. А., Каваленка В. В., Лук'янчык І. Д. і інш. // Весн. Брэсцкага ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук. 2006. № 3. С. 81—90.
4. Каваленка В. В., Ламакова В. А. // Весн. Брэсцкага ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук. 2007. № 1. С. 87—91.
5. Ламакова В. А., Каваленка В. В., Лук'янчык І. Д. і інш. // Весн. Брэсцкага ун-та. Сер. прыродазнаўчых навук. 2007. № 1. С. 100—107.
6. Ярчак М. П., Каваленка В. В., Ламакова В. А., Салішчаў В. Г. // Агрэкологія: сб. науч. тр. Горки, 2007. Вып. 5: Современное состояние, проблемы и перспективы защиты растений. С. 72—77.
7. Коваленко В. В., Ювко А., Лиепиньш Э. // Латв. хим. журн. 2008. Вып. 4. С. 398—399.
8. Ерчак Н. П., Коваленко В. В., Ленивко С. М. и др. // Журн. общей химии. 2008. Т. 78, вып. 9. С. 1580—1581.
9. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84. — Введ. 01.07.86. М.: Мин-во сельского хозяйства СССР: Изд-во стандартов, 1985. — 57 с.
10. Семена сельскохозяйственных культур. Определение посевных качеств семян. Термины и определения: ГОСТ 20290-74. — Введ. 01.07.75. М.: Всесоюзный институт растениеводства: Изд-во стандартов, 1975. — 23 с.
11. Рокитский П. Ф. Биологическая статистика. Минск, 1973. — 316 с.

V. V. KAVALENKA, V. A. LAMAKOVA, N. P. ERCHAK

GROWTH REGULATING ACTIVITY OF HYDROOXALATES OF METHYLBIS(PHENYLMETHYL)- γ -AMINOPROPYLSILANES

Summary

New water solvable organosilicon compound — hydrooxalate methylbis(phenylmethyl)- γ -(N-cyclohexyl)aminopropylsilane was synthesized. The growth regulating activity of the hydrooxalate obtained and the hydrooxalates of methylbis(phenylmethyl)- γ -piperidinopropylsilane and methylbis(phenylmethyl)- γ -pyrrolidinopropylsilane described by the authors earlier was studied on radish and lupin. There were determined the concentrations of hydrooxalates solutions which stimulate as well as inhibit germination energy, germination capacity and general length growth of the embryonic roots of the germinating seeds.

УДК 577.152.1: 547.594.3 + 632.154

М. В. ПОТАПОВИЧ, Д. Б. РУБИНОВ, А. Н. ЕРЕМИН

**ВЛИЯНИЕ ГЕРБИЦИДОВ ТРАЛКОКСИДИМА И СЕТОКСИДИМА
НА ГЛЮКОЗООКСИДАЗУ *ASPERGILLUS NIGER*
ПРИ ОКИСЛЕНИИ ГЛЮКОЗЫ В ПРИСУТСТВИИ
2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛА
И ГЕКСАЦИАНО-(III)ФЕРРАТА КАЛИЯ**

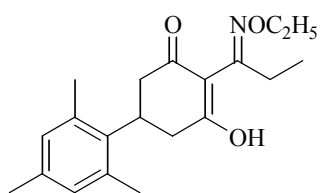
Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 12.10.2007)

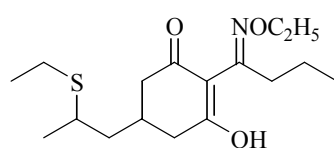
Оптимизировано глюкозооксидазное окисление глюкозы в присутствии 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и гексациано-(III)феррата калия (ФК) как акцепторов электронов для исследования влияния потенциальных пестицидов на глюкозооксидазу (ГО). Установлено, что ферментативную реакцию (30 нМ ГО) можно проводить в аэробных условиях в цитратно-фосфатном буфере (ЦФБ), рН 3,5, содержащем 5 % диметилформамида (ДМФ). Присутствие кислорода в растворе отражается на операционной стабильности ГО, которая повышается по мере расходования O_2 и продукта его восстановления — H_2O_2 . Сравнено влияние сетоксидима и тралкоксидима на ГО при рН 3,5 в системах, содержащих ДХФИФ, ФК и их сочетание. Наибольшее воздействие гербицидов на ГО наблюдается в системе с ДХФИФ. В ферментативной системе при рН 3,5 можно использовать ФК. Определены эффективные константы K_m , K_i и $k_{кат}$ для глюкозы при ее окислении в присутствии ГО, ДХФИФ и гербицидов в 20 мМ ЦФБ, рН 3,5 с 5 % ДМФ при 20 °С. С увеличением концентрации сетоксидима и тралкоксидима тип ингибирования изменяется от смешанного ($K_m^i > K_m$, $V_{макс}^i < V_{макс}$) до рассогласованного ($K_m^i < K_m$, $V_{макс}^i < V_{макс}$).

Введение. В настоящее время технология возделывания сельскохозяйственных культур немыслима без использования химических средств защиты растений [1]. Среди многообразия препаратов, регулирующих рост растений, выделяется группа гербицидов на основе производных циклогексан-1,3-диона [1–3]. Их действующие вещества структурно родственны природным 2-ацилциклоалкан-1,3-дионам, которые часто встречаются как в растительном, так и в животном мире и выполняют различные защитные функции [4]. Производные циклогексан-1,3-диона могут регулировать нежелательный рост широколиственных и злаковых растений. С точки зрения экологической безопасности особое значение среди этой группы веществ имеют селективные

противозлаковые препараты оксимной природы, такие как кусагард, сетоксидим, клетодим, клопроксидим, циклоксидим, профоксидим, тепралоксидим, тралкоксидим, бутроксидим [3; 5]. Действующие вещества этих препаратов по химическому строению — простые эфиры оксимов 2-ацилциклогексан-1,3-дионов, различающиеся между собой только строением некоторых заместителей в циклической части молекулы и боковой ацильной цепи.



Тралкоксидим



Сетоксидим

Синтетические биологически активные соединения, попадая в растения и почву, загрязняют биосферу [6]. В связи с этим важно изучение эффектов, оказываемых биологически активными соединениями как в целом на живые организмы, так и на уровне ключевых ферментов метаболических систем. Детоксикацию пестицидов в почве осуществляют почвенные бактерии и мицелиальные грибы с участием окислительно-восстановительных ферментов, в частности флавиновых оксидаз, среди которых важное место принадлежит глюкозооксидазе (ГО; КФ 1.1.3.4), окисляющей глюкозу до δ -глюконолактона и восстанавливающей растворенный в среде кислород до пероксида водорода [6; 7]. Пероксид водорода является субстратом гемсодержащих пероксидаз, которые полимеризуют фенольные производные и включают их в нерастворимый почвенный гумус [6; 7]. Так как ГО является одним из ключевых ферментов клеточного метаболизма, представляется важным разработка на ее основе ферментативной системы для исследования влияния потенциальных пестицидов на ее активность.

Акцептором электронов в реакциях, катализируемых ГО, может быть не только молекулярный кислород, но и множество природных и синтетических соединений [8–10], восстановление которых приводит к образованию свободных радикалов [11; 12]. Акцепторы электронов для ГО могут быть разделены на четыре группы на основе формы их рН-зависимостей [9]: соединения с рН-оптимумом при 5,6 (кислород и хиноны) и около 7,5 (диамины), соединения с высокой (феррицианид) и низкой (индофенолы) плотностью заряда, имеющие оптимум при низком рН. Применение окислительно-восстановительных индикаторов весьма удобно в аналитических целях, так как их окисление и восстановление можно регистрировать стандартными фотометрическими методами.

Цель работы — оптимизация процесса окисления глюкозы с участием ГО *Aspergillus niger* с использованием 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) и гексациано-(III)феррата калия (ФК) в качестве акцепторов электронов, и изучение влияния гербицидов тралкоксидима и сетоксидима на ГО в смеси цитратно-фосфатный буфер (ЦФБ), рН 3,5 — 5 % диметилформамид (ДМФ) на окисление глюкозы.

Материалы и методы исследования. В работе использовали ГО *A. niger* (КФ 1.1.3.4) с отношением поглощения $\alpha/\gamma = 11,5$ и $\beta/\gamma = 0,77$ («Fluka», Швейцария).

Остальные реактивы были производства «Реахим» (Россия). Тралкоксидим получали по методике, описанной в работе [5]. Сетоксидим выделяли из препарата «Набу» («NipponSoda», Япония). Гербициды растворяли в ДМФ. Концентрацию ГО определяли спектрофотометрически на приборе «Specord M 400» («Carl Zeiss», Германия). При расчете концентрации ГО использовали молярный коэффициент поглощения 14100 (452 нм) $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13].

Ферментативное окисление глюкозы проводили при 20 °С в ЦФБ, pH 3,5, с 5 % ДМФ. Перечень компонентов реакционной среды и их концентрации указаны в подписях к рисункам и в заглавиях таблиц. За накоплением продуктов восстановления ДХФИФ и ФК следили спектрофотометрически на фотометре КФК-3 (Россия) при длинах волн 509 и 420 нм соответственно. При расчете начальной скорости и концентрации продуктов восстановления ДХФИФ и ФК использовали молярные коэффициенты поглощения $\epsilon_{509} = 4644$ (ДХФИФ) и $\epsilon_{420} = 989,5$ (ФК) $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Для определения константы Михаэлиса (K_m , М) и максимальной скорости окисления ($V_{\text{макс}}$, $\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$) зависимости v_0 от начальной концентрации глюкозы, ДХФИФ и ФК линеаризовали в координатах Лайнуивера—Берка [14]. Эффективную константу скорости инактивации ГО в ходе восстановления ДХФИФ и ФК ($k_{\text{ин}}$, c^{-1}), характеризующую операционную стабильность фермента, определяли графически по методике [15]. Для этого строили линейные анаморфозы кинетических кривых уменьшения концентрации ДХФИФ и ФК в координатах $1/\ln([\text{ДХФИФ (или ФК)}]_0/[\text{ДХФИФ (или ФК)}]_t)$ от $1/t$, где t — время, с. Отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, равен $-k_{\text{ин}}$. Для расчета эффективной константы ингибирования (K_i , М) использовали уравнения двухпараметрических типов ингибирования, приведенных в работе [16].

Результаты и их обсуждение. В 20 мМ ЦФБ, pH 3,5—4,5 с 5 % ДМФ интенсивность поглощения ДХФИФ в области 509 нм не изменяется в отсутствие ГО и/или глюкозы. В этих условиях интенсивность полосы поглощения при 509 нм уменьшается в присутствии ГО и глюкозы, т. е. наблюдается ферментативное окисление глюкозы и восстановление ДХФИФ. Начальная скорость восстановления ДХФИФ уменьшается с увеличением pH (3,5—8,0) 20 мМ ЦФБ с 5 % ДМФ: при pH 3,5 в присутствии 30 нМ ГО и 15 мМ глюкозы $v_0 = 3,99\cdot 10^{-7}$ $\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$, pH 5,5 — $1,16\cdot 10^{-7}$ $\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$ и pH 8,0 — $0,03\cdot 10^{-7}$ $\text{M}\cdot\text{c}^{-1}$. Аналогичная зависимость « v_0 — pH» получена при окислении 50 мМ глюкозы в присутствии ГО *P. vitale* в среде с pH 5,2—8,0, не содержащей кислород [8].

На кинетических зависимостях окисления глюкозы в присутствии ГО и ДХФИФ обнаруживается лаг-период, продолжительность которого составляет 10—30 с. Лаг-период отражает конкуренцию кислорода, присутствующего в среде, и ДХФИФ за взаимодействие с восстановленной формой ГО. Зависимость v_0 восстановления ДХФИФ от концентрации ГО линейна в диапазоне 5—100 нМ фермента. В экспериментах концентрация ГО в пробе составляла 30 нМ, что обеспечивало быстрое удаление кислорода из среды в начальной стадии процесса [10].

Скорость инактивации ГО в начале процесса окисления 15 мМ глюкозы и восстановления 0,6 мМ ДХФИФ очень высока: в 20 мМ ЦФБ с 5 % ДМФ, pH 3,5 в течение ~ 20 с фермент инактивируется с $k_{\text{ин}}$, равной 2,74 c^{-1} . Видимо,

пероксид водорода, образующийся в начале процесса вследствие восстановления O_2 [9; 10], является основной причиной инактивации ГО. Известно, что восстановленная форма ГО приблизительно в 100 раз более чувствительная к H_2O_2 , чем окисленная [9; 17]. По мере расходования H_2O_2 скорость инактивации ГО уменьшается и через 11–12 мин достигает минимальной величины, равной $9,6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ (11,5–30 мин). На этом этапе процесса инактивацию ГО вызывают радикальные продукты, образующиеся при одноэлектронном восстановлении ДХФИФ [11; 12].

В табл. 1 приведены кинетические характеристики окисления глюкозы и восстановления ДХФИФ в разных условиях. Как видно, ДХФИФ восстанавливается в 7 раз быстрее, чем окисляется глюкоза (системы 1 и 2). Окисление восстановленной ГО кислородом максимально при pH 5,6–5,7 [8; 9]. При глюкозооксидазном окислении глюкозы при 25 °C в 50 мМ ацетатном буфере, pH 5,6 K_M для кислорода равна $(2,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-4} \text{ М}$ [8]. При использовании ДХФИФ в качестве акцептора электронов при окислении 50 мМ глюкозы в 20 мМ ЦФБ, pH 3,5 при 20 °C $K_M = 4,3 \text{ мМ}$ (2). Более высокая величина K_M свидетельствует о меньшем сродстве ДХФИФ к ГО по сравнению с O_2 . При наличии в среде одновременно O_2 и ДХФИФ фермент в первую очередь окисляется кислородом, и в растворе накапливается H_2O_2 , что отражает лаг-период на кинетических зависимостях, а также высокая скорость инактивации ГО в начальный период ферментативного окисления глюкозы. ДХФИФ не остается безучастным в процессе, пока в среде присутствует O_2 . Он в существенной степени снижает сродство глюкозы к ферменту: K_M , характеризующая окисление глюкозы в лаг-периоде, равна 166,7 мМ.

Т а б л и ц а 1. Кинетические характеристики окисления глюкозы при 20 °C в присутствии ГО, ДХФИФ и $K_3Fe(CN)_6$

Система	Среда	[Глюкоза], мМ	[ДХФИФ], мМ	$K_M \cdot 10^3$, М	$k_{кат}$, с^{-1}	$(k_{кат}/K_M) \cdot 10^{-3}$, $\text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$
1	20 мМ ЦФБ, pH 3,5, 50 нМ ГО	10–70	0,60	6,5	33,4	5,1
2	20 мМ ЦФБ, pH 3,5, 50 нМ ГО	50	0,15–0,75	4,3	234,2	54,0
3	20 мМ ЦФБ, pH 3,5, 5 % ДМФ, 30 нМ ГО	5,5–11	0,60	$4,2 \pm 1,0$	$24,5 \pm 1,5$	$5,80 \pm 0,17$
4	10 мМ ЦФБ, pH 3,5, 5 % ДМФ, 30 нМ ГО	15	0,2–4,0*	1,7	51,7	29,7

* $K_3Fe(CN)_6$

Пестициды, как правило, плохо растворимы в воде, поэтому для приготовления их препаративных форм используют органические растворители. Граминцидный препарат «ГРАСП», содержащий в качестве действующего вещества тралкоксидим, поставляется в смеси с «прилипателем», включающем минеральное масло и жирные спирты [2]. При 24 °C тралкоксидим хорошо растворим в дихлорметане, толуоле, этилацетате и несколько хуже в ацетоне, метаноле и гексане [1]. Сетоксидим также хорошо растворим в органических растворителях [1]. Ясно, что эффективность влияния этих гербицидов на активность ГО будет зависеть от присутствия в среде органического растворителя, хорошо смешивающегося с водой. В качестве такого растворителя нами выбран ДМФ.

На рис. 1, *a* показано влияние концентрации ДМФ на начальную скорость восстановления ДХФИФ при окислении глюкозы в присутствии ГО (1). В табл. 1 (3) приведены кинетические характеристики процесса в смеси 20 мМ ЦФБ, рН 3,5, 5 % ДМФ. Как видно, при этой концентрации ДМФ уменьшается величина K_M и $k_{кат}$, но эффективность процесса окисления глюкозы, характеризуемая отношением $k_{кат}/K_M$, остается без изменения (ср. системы 1 и 3). Сравнение зависимостей « $1/v_0 - 1/[глюкоза]_0$ » для системы в отсутствие ДМФ и при его наличии в среде (5 %, или 0,65 М) показывает, что величины K_M и $V_{макс}$ в последнем случае меньше по сравнению с аналогичными характеристиками в отсутствие соразтворителя, а угол наклона прямых в системе с ДМФ больше, чем в системе без органического растворителя. Эти соотношения свидетельствуют, что ингибирование ГО ДМФ является рассогласованным [16]. Эффективная константа ингибирования ГО при окислении глюкозы в присутствии ДХФИФ равна 0,35 М. Эти данные позволяют предположить, что

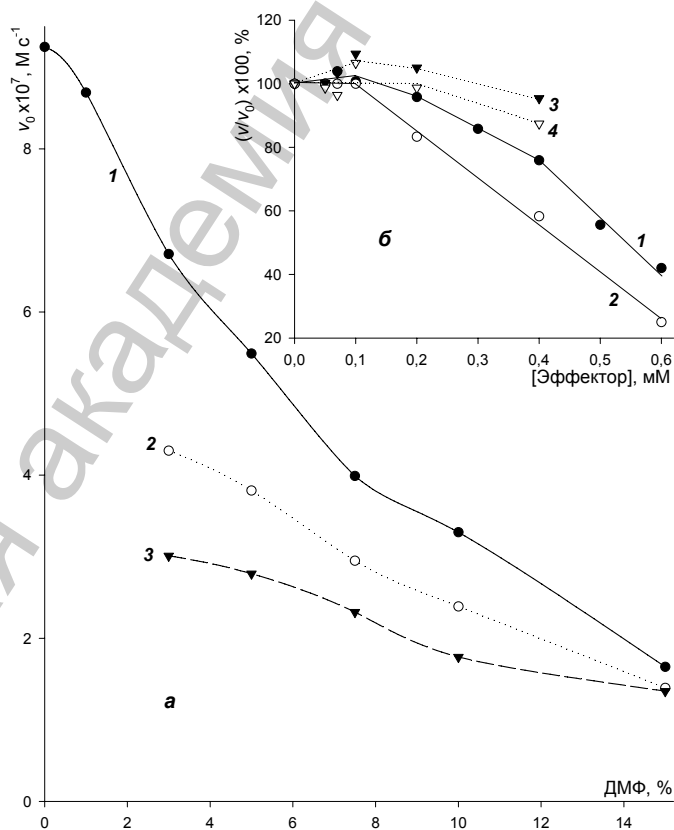


Рис. 1. *a* — влияние концентрации ДМФ в 20 мМ ЦФБ, рН 3,5 при 20 °С на начальную скорость восстановления 0,6 мМ ДХФИФ при окислении 30 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО, 0,4 мМ сетоксида (2) или тралкоксида (3) (1 — в отсутствие эффекторов); *b* — зависимость относительной скорости восстановления 0,6 мМ ДХФИФ от концентрации эффектора (1 и 3 — сетоксид, 2 и 4 — тралкоксид) при окислении 30 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО в 20 мМ ЦФБ, рН 3,5 с 5 % ДМФ (1 и 2) или ацетонитрила (3 и 4)

ДМФ повышает сродство фермента к глюкозе, но, видимо, препятствует распаду комплекса [ГО(восстановленная)– δ -глюконолактон].

В присутствии сетоксидима (рис. 1, *a*, 2) и тралкоксидима (3) угнетающее влияние ДМФ на окисление глюкозы выражено не столь ярко по сравнению с системой, не содержащей эти эффекторы (1). Однако гербициды при концентрации $> 0,1$ мМ сами ингибируют ГО (рис. 1, *б*, 1 и 2). Степень ингибирования зависит от типа смешивающегося с водой органического растворителя. При наличии в смеси апротонного ацетонитрила гербициды слабо влияют на ГО (ср. 1 и 3, 2 и 4).

На основании данных рис. 1, *б* выбраны концентрации тралкоксидима и сетоксидима, при которых изучены кинетические закономерности окисления глюкозы в присутствии ГО в смеси 20 мМ ЦФБ, pH 3,5, 5 % ДМФ. После трансформации зависимостей $\langle v_0 - [\text{глюкоза}]_0 \rangle$ в координатах Лайнуивера–Берка вычислены кинетические параметры процесса (K_M , $k_{\text{кат}}$ и K_i), представленные на рис. 2. Сетоксидим и тралкоксидим уменьшают в 1,2–1,5 и 1,2–1,7 раза, соответственно, эффективность ГО, характеризуемую в терминах $k_{\text{кат}}/K_M$. С увеличением концентрации сетоксидима тип ингибирования изменяется от смешанного ($K_M^i > K_M$, $V_{\text{макс}}^i < V_{\text{макс}}$) при концентрации эффектора 0,3 и 0,4 мМ до рассогласованного ($K_M^i < K_M$, $V_{\text{макс}}^i < V_{\text{макс}}$) при его содержании в среде 0,5 мМ (рис. 2, *б*). Аналогичное изменение типа ингибирования наблюдается и в случае тралкоксидима (рис. 2, *a*): при его концентрации 0,2 мМ — смешанное, а при 0,3 мМ и выше — рассогласованное ингибирование. Следовательно, эти эффекторы при концентрации меньше 0,3 мМ затрудняют связывание глюкозы с ГО, но фермент, модифицированный гербицидами, все же способен связывать и окислять глюкозу. Однако при больших концентрациях сетоксидима и тралкоксидима, хотя и облегчается связывание глюкозы с ферментом, но ГО, модифицированная эффектором, не способна окислять субстрат. Величина K_i максимальна при концентрации гербицидов, равной 0,3 мМ (рис. 2, 2). При больших и меньших концентрациях гербицидов их сродство к ГО увеличивается.

Акцептором электронов в реакции окисления глюкозы, катализируемой ГО, может быть не только ДХФИФ, но и феррицианид калия [9; 10]. Общим для этих акцепторов является аналогичный ход pH-зависимостей: с уменьшением pH возрастает скорость их восстановления [9; 10]. При окислении 15 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО в 10 мМ ЦФБ, pH 3,5 с 5 % ДМФ зависимость v_0 от концентрации $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ выходит на плато при его содержании, равном 2–3 мМ. Большие концентрации ФК уменьшают скорость глюкозооксидазного окисления глюкозы. В табл. 1 (система 4) приведены кинетические характеристики окисления глюкозы в присутствии ФК как окислителя восстановленной формы ГО. K_M для ФК (4) меньше чем для ДХФИФ (2). Хотя ФК имеет большее сродство к ГО, но он окисляет восстановленный фермент в 4,5 раза медленнее, чем ДХФИФ.

ФК, как и ДХФИФ влияет на операционную стабильность ГО. При pH 3,5 в начале ферментативного окисления глюкозы и восстановления $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (~ 30 с) ГО инактивируется с $k_{\text{ин}}$, равной $1,22 \text{ с}^{-1}$. По мере разложения H_2O_2 , образующегося на начальной стадии, когда в среде присутствует кислород, $k_{\text{ин}}$ уменьшается и в диапазоне 12–30 мин достигает величины $6,85 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$.

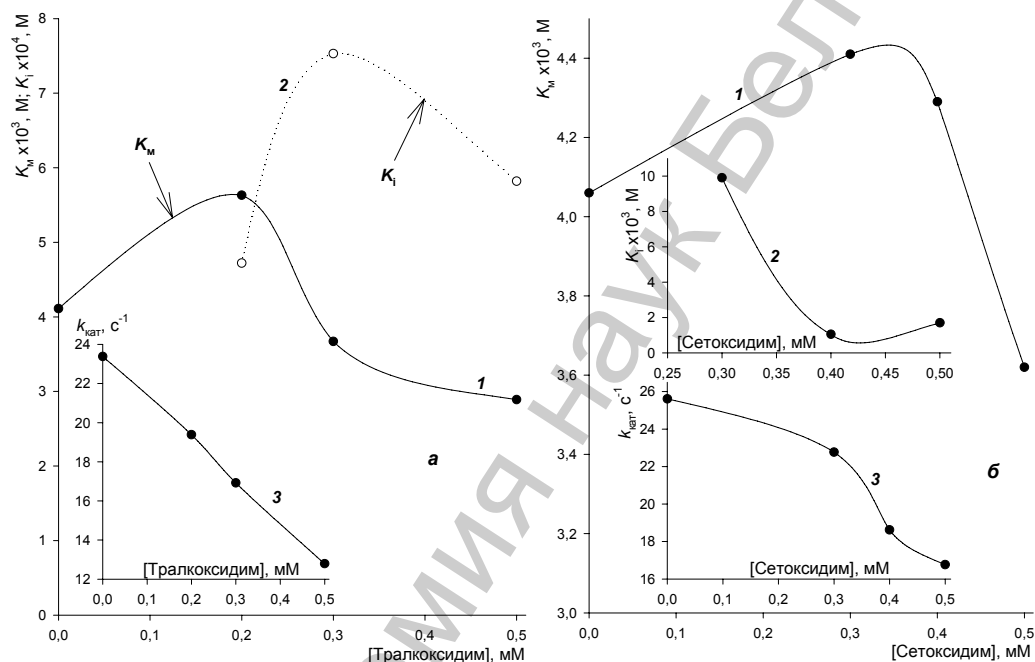


Рис. 2. Влияние концентрации тралкоксидима (а) и сетоксидима (б) на кинетические параметры (1 — K_m , 2 — K_i , 3 — $k_{кат}$) при окислении 6–20 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО и 0,6 мМ ДХФИФ в 20 мМ ЦФБ, pH 3,5 с 5 % ДМФ при 20 °С

Скорость окисления глюкозы в присутствии ГО и ФК сильно зависит от концентрации ЦФБ (рис. 3, а, 1). Оптимальным является 10 мМ буфер. Концентрация буфера также сильно влияет на степень ингибирования ГО гербицидами (рис. 3). Тралкоксидим в большей степени ингибирует ГО, чем сетоксидим: фермент полностью теряет активность в присутствии 0,5 мМ тралкоксидима в 20 мМ ЦФБ, pH 3,5 с 5 % ДМФ (рис. 3, б, 4). Видимо, высокая ингибирующая эффективность тралкоксидима обусловлена его большей гидрофобностью по сравнению с сетоксидимом из-за наличия мезитила в 5-м положении циклогексан-1,3-дионного фрагмента, в то время как у сетоксидима в этом положении находится тиоэтильная группа. В буфере с большей молярностью тралкоксидим, как гидрофобное соединение, концентрируется на поверхности белковой глобулы ГО, что повышает эффективность ингибирования фермента (ср. 3 и 4, рис. 3, б). Меньшая степень ингибирования ГО, наблюдаемая в присутствии сетоксидима, свидетельствует о важности взаимодействия гербицидов с гидрофобными сайтами фермента.

В табл. 2 сравнено влияние акцептора электронов на v_0 при окислении глюкозы в присутствии ГО и 0,5 мМ гербицида в 20 мМ ЦФБ, pH 3,5, содержащем 5 % ДМФ. В данных условиях меньшая начальная скорость восстановления акцептора отмечена для ДХФИФ, а большая — в случае ФК. В системе, включающей два электронных акцептора, ГО характеризуется высокой операционной стабильностью, в то время как в присутствии ДХФИФ наблюдается

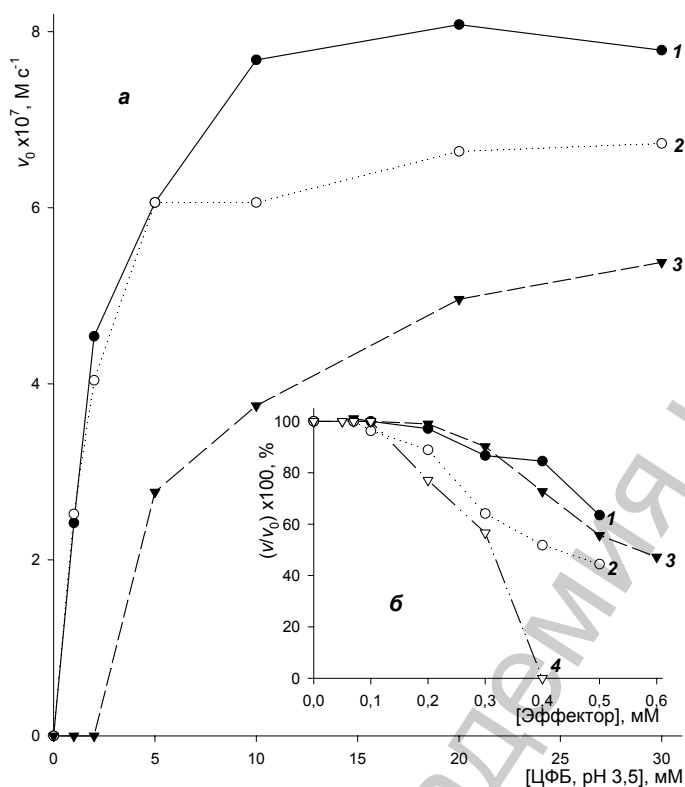


Рис. 3. *a* — влияние концентрации ЦФБ, pH 3,5, содержащего 5 % ДМФ, при 20 °С на начальную скорость восстановления 2,0 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ при окислении 15 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО, 0,3 мМ сетоксидима (2) или тралкоксидима (3) (1 — в отсутствие эффекторов); *б* — зависимость относительной скорости восстановления 2,0 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ от концентрации эффектора (1 и 3 — сетоксидим, 2 и 4 — тралкоксидим) при окислении 15 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО в 10 (1, 2) или 20 (3, 4) мМ ЦФБ, pH 3,5 с 5 % ДМФ

самая высокая скорость инактивации фермента в процессе окисления глюкозы и восстановления акцептора электронов. Однако для системы с ДХФИФ характерна наибольшая степень ингибирования ГО. В присутствии ДХФИФ и $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ сетоксидим вообще не влияет на ГО.

Таблица 2. Влияние акцептора электронов на начальную скорость окисления 15 мМ глюкозы в присутствии 30 нМ ГО, 0,5 мМ сетоксидима или тралкоксидима в 20 мМ ЦФБ, pH 3,5, содержащем 5 % ДМФ, при 20 °С

Акцептор	$v_0 \cdot 10^7, \text{M} \cdot \text{s}^{-1}$	Операционная стабильность ГО		$(v/v_0) \times 100, \%$	
		$k_{\text{ин}}, \text{c}^{-1}$	$t, \text{мин}$	Сетоксидим	Тралкоксидим
*0,6 мМ ДХФИФ	4,0—4,89	$1,8 \cdot 10^{-4}$	7—30	48	39
**2,0 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	9,1—10,7	$6,9 \cdot 10^{-5}$	12—30	64	44
*0,6 мМ ДХФИФ + 2,0 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	6,1—6,4	0	3,5—30	100	73

*За процессом следили по изменению поглощения на 509 нм, а в случае ** — на 420 нм.

Как известно [9], ГО ингибируют микромолярные концентрации тяжелых металлов (ртути, свинца и серебра). При низких pH ингибиторами ГО являются галоидные ионы [9], например, 0,1 М хлорид калия при pH 3 полностью ингибирует фермент [18]. D-арабиноза и 2-дезоксид-D-глюкоза ингибируют ГО по конкурентному типу [9]. Гидразин, гидроксилламин и фенилгидразин в миллимолярных концентрациях частично ингибируют фермент [9]. 8-Гидроксихинолин, нитрат натрия и семикарбазид при концентрации 10 мМ уменьшают активность ГО на 11, 13 и 20 % соответственно [9]. 1,4-Диаминобутан ингибирует ГО при pH 7,65 и ионной силе, равной 0,05 [19]. Считают [19], что 1,4-диаминобутан, взаимодействуя с ГО, сдвигает pK_a важной для катализа кислой группы фермента с 7,6 до 7,1. Активный центр ГО, кроме молекулы ФАД, содержит три аминокислотных остатка, участвующие в связывании глюкозы и акцепторов электронов: His-516 (pK_a 6,9), Glu-412 (pK_a 3,4) и His-559 ($pK_a > 8$) [9; 10; 20]. Два последних аминокислотных остатка за счет водородной связи связаны между собой [10; 20]. Протонирование каждого из них сильно влияет на все константы скорости окисления глюкозы [20]. Видимо, тралкоксидим и сетоксидим при малых концентрациях способны модифицировать гидрофобные сайты субъединиц ГО, что приводит к изменению конформации фермента и затрудняет связывание глюкозы. При больших концентрациях эти гербициды проникают в активный центр ГО и облегчают связывание глюкозы, но препятствуют ее окислению до δ -глюконолактона, так как для ДХФИФ нет доступа к восстановленному ФАД.

Заключение. Таким образом, исследование показало, что глюкозооксидазную реакцию можно проводить в среде с небольшим содержанием органического соразтворителя в аэробных условиях, так как при сравнительно высокой концентрации фермента кислород эффективно расходуется в начальной стадии процесса. Присутствие кислорода в растворе отражается на операционной стабильности ГО, которая повышается по мере расходования кислорода и продукта его восстановления — пероксида водорода. Кроме ДХФИФ, как окислителя восстановленного ФАД, в ферментативной системе можно использовать ФК. Однако их совместное использование нецелесообразно, так как при наличии в среде двух акцепторов электронов, видимо, затруднено взаимодействие гербицидов с активным центром ГО.

Изучение влияния сетоксидима и тралкоксидима на ГО при pH 3,5 в системах, содержащих ДХФИФ, ФК и их сочетание в качестве окислителей восстановленного фермента, показало, что наибольшее воздействие гербицидов на ГО наблюдается в системе с ДХФИФ. Систему с ФК при низкой концентрации ЦФБ можно положить в основу тест-системы на тралкоксидим. Однако биохимическое исследование потенциальных пестицидов лучше проводить в системе с ДХФИФ. В этих условиях изученные гербициды в зависимости от концентрации являются смешанными и рассогласованными ингибиторами ГО.

Часть данной работы выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта Х07М-006.

Литература

1. Мельников Н. Н., Новожилов К. В., Белан С. Р. Пестициды и регуляторы роста растений. Справ. М., 1995. — 576 с.
2. ГРАСП, СК [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.syngenta.ru/cp/products/info/?p=6&a=info>.
3. Лахвич Ф. А., Рубинов Д. Б., Рубинова И. Л. // Земледелие и защита растений. 2006. № 4 (47). С. 33—35.
4. Рубинов Д. Б., Рубинова И. Л., Ахрем А. А. // ХПС. 1995. № 5. С. 635—663.
5. Патент Австралии AU 556,148 / K. G. Watson, L. A. Garson, G. J. Bird, L. E. Cross, G. J. Farquharson. Оп. 23.10.86.
6. Экологическая химия / Под ред. Ф. Корте. М., 1997. — 396 с.
7. Рабинович М. Л., Болобова А. В., Васильченко Л. Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 1. С. 5—23.
8. Александровский Я. А., Бежекина Л. В., Родионов Ю. В. // Биохимия. 1981. Т. 46, № 4. С. 708—716.
9. Wilson R., Turner A. P. F. // Biosens. Bioelectron. 1992. Vol. 7, N 3. P. 165—185.
10. Wohlfahrt G., Trivic S., Zeremski J. et al. // Mol. Cel. Biochem. 2004. Vol. 260, N 1—2. P. 69—83.
11. Metosh-Dickey C. A., Mason R. P., Winston G. W. // Free Radic. Biol. Med. 1998. Vol. 24, N 1. P. 155—160.
12. Trivic S., Leskovac V., Zeremski J. et al. // Bioorganic Chemistry. 2002. Vol. 30, N 2. P. 95—106.
13. Swoboda V. E. P., Massey V. // J. Biol. Chem. 1965. Vol. 240, N 5. P. 2209—2215.
14. Березин И. В., Клёсов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., 1976. С. 77—111.
15. Еремин А. Н., Литвинчук А. В., Метелица Д. И. // Биохимия. 1996. Т. 61, № 4. С. 664—679.
16. Крупянко В. И. // Биохимия. 2007. Т. 72, № 4. С. 473—485.
17. Bourdillon C., Thomas V., Thomas D. // Enz. Microb. Technol. 1982. Vol. 4, N 3. P. 175—180.
18. Weibel M. K., Bright H. J. // J. Biol. Chem. 1971. Vol. 246, N 9. P. 2734—2744.
19. Voet J. G., Andersen E. C. // Arch. Biochem. Biophys. 1984. Vol. 233, N 1. P. 88—92.
20. Leskovac V., Trivic S., Wohlfahrt G. et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005. Vol. 37, N 4. P. 731—750.

M. V. POTAPOVICH, D. B. RUBINOV, A. N. ERYOMIN

EFFECT OF THE HERBICIDES TRALKOXYDIM AND SETHOXYDIM ON THE GLUCOSE OXIDASE *ASPERGILLUS NIGER* OXIDATION OF GLUCOSE IN THE PRESENCE OF 2,6-DICHLOROINDOPHENOL AND POTASSIUM FERRICYANIDE

Summary

The process of the glucose oxidase (GO) catalysed oxidation of glucose in the presence of 2,6-dichloroindophenol and potassium ferricyanide as the electron acceptors has been optimised for study of potential pesticides influence on GO. The enzyme reaction (30 nM GO) is possible under aerobic conditions and in the citrate-phosphate buffer (CPB), pH 3,5 with 5 % dimethylformamide (DMF). The oxygen presence in the solution is reflected on the GO operational stability, which increased with the O₂ and the product of its reduction — H₂O₂ expenditure. The influence of sethoxydim and tralkoxydim on GO at pH 3.5 in systems containing 2,6-dichloroindophenol, potassium ferricyanide and their combination is compared. The greatest influence of the herbicides on GO is observed in system with 2,6-dichloroindophenol. In the enzyme system at pH 3,5 potassium ferricyanide can be used. The effective constants K_M , K_i and k_{cat} of glucose have been determined for its oxidation in the presence of GO, 2,6-dichloroindophenol and herbicides in 20 mM CPB, pH 3.5 with 5 % DMF at 20 °C. Increasing the sethoxydim and tralkoxydim concentration changes the type of the inhibition from the mixed ($K_M^i > K_M$, $V_{max}^i < V_{max}$) up to the unmatched ($K_M^i < K_M$, $V_{max}^i < V_{max}$).

УДК 612.017.1:616-097

*Н. В. ПИВЕНЬ, Е. Е. ОРЛОВА, Л. Н. ЛУХВЕРЧИК***ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ АУТОАНТИТЕЛ
К ДЕКАРБОКСИЛАЗЕ ГЛЮТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ —
МАРКЕРА САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА***Институт биоорганической химии НАН Беларуси**(Поступила в редакцию 13.01.2010)*

Представлены сведения об аутоантителах к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (AT-GAD) — высокоинформативном диагностическом и патогенетическом маркере сахарного диабета 1 типа (СД1), присутствие которых в крови может быть обнаружено за месяцы и годы до появления первых клинических симптомов сахарного диабета. Авторами разработан новый метод иммуноферментного анализа AT-GAD в формате твердофазного ELISA и проведена его апробация на клиническом материале. Обоснована целесообразность использования ИФА концентрации аутоантител к GAD как количественного клинко-диагностического, патогенетического и прогностического маркера СД1 различных стадий у детей и взрослых.

Введение. Сахарный диабет 1 типа (инсулинозависимый, СД1) является основной причиной длительной утраты здоровья, ограничения трудоспособности, ранней инвалидности и преждевременной смертности больных во всех странах, затрагивающей лиц любого возраста и национальности. Эта патология, развиваясь в детском и молодом возрасте, требует огромных затрат на пожизненную заместительную инсулинотерапию, приводит к необходимости соблюдения определенного образа жизни и, инициируя развитие поздних осложнений, ведет к ограничению жизнедеятельности и сокращению продолжительности жизни [1]. Около 90 % расходов на лечение СД1 приходится на оказание помощи пациентам с поздними осложнениями диабета, число которых составляет 6 % от общего количества больных СД1. Рост заболеваемости СД1 определяет эту проблему как одну из наиболее социально значимых. Совершенно очевидно, что раннее выявление больных СД1 и лиц, предрасположенных к его развитию, проведение своевременных профилактических мероприятий и адекватной терапии может существенно снизить заболеваемость и дать значимый экономический эффект. Однако обоснование и реализация превентивных мероприятий возможны только после детального понимания механизмов развития (патогенеза) данного заболевания и роли молекулярно-

генетических основ аутоиммунных нарушений, сопровождаемых СД1. Обнаружение у больных СД1 аутоантител к компонентам поджелудочной железы служит прямым и неопровержимым доказательством принадлежности СД1 к аутоиммунным заболеваниям, которые в большинстве случаев развиваются у лиц с генетической предрасположенностью [2].

Инсулинозависимый сахарный диабет сопровождается деструкцией β -клеток поджелудочной железы, следствием которой является недостаток инсулина в организме. Инсулин является одним из основных антигенов β -клеток, который с полным правом можно отнести к органоспецифическим антигенам.

Декарбоксилаза глутаминовой кислоты (glutamic acid decarboxylase — GAD) — еще один антиген, связанный с развитием инсулинозависимого диабета, в связи с чем в последние годы именно к этому соединению привлечено внимание многих исследователей [3].

GAD — мембранный фермент, осуществляющий биосинтез тормозного нейромедиатора центральной нервной системы млекопитающих — гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), был впервые выявлен у пациентов с генерализованными неврологическими расстройствами. Субстрат GAD — глутаминовая кислота является медиатором процессов торможения в нейронах головного мозга. GAD обнаружена в нейронах головного мозга, мозжечке, спинном мозге, клетках сетчатки глаза, что доказывает его важную роль в деятельности центральной нервной системы. Кроме того, этот фермент был обнаружен в островках Лангерганса поджелудочной железы, а также в почках, семенниках и яичниках [4]. GAD играет важную роль в развитии СД1 типа как основной аутоантиген, возникающий при аутоиммунной деструкции β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, продуцирующих инсулин [5].

Существуют две изоформы GAD — GAD 65 (молекулярная масса 65 кДа) и GAD 67 (67 кДа), которые кодируются разными генами, расположенными на 10 и 2 хромосомах соответственно. Однако экзон-интронная организация этих двух генов доказывает, что они происходят из одного исходного гена GAD. Субъединица GAD включает два участка: С-концевой — 500 аминокислотных остатков и N-концевой — 95–100 остатков [6]. С-концевой участок содержит пиридоксальфосфатсвязывающий участок и длинный сегмент, идентичный для GAD 65 и GAD 67. Гомология первичной структуры между двумя формами глутаматдекарбоксилазы для С-концевого участка составляет 73 %, а для N-концевого — 23 %.

GAD 65 и GAD 67 экспрессируются в центральной нервной системе человека и животных, однако в островковых клетках поджелудочной железы человека в больших количествах экспрессирован только GAD 65 (в отличие от крыс, у которых присутствуют оба изофермента). Имеют место и различия в субклеточной локализации GAD 65 и GAD 67: GAD 65 в основном гидрофобен и заякорен с синапсоподобными везикулами, а GAD 67 находится в цитоплазме возле ядра [7]. Различия в субклеточной локализации зависят от сигналов в NH_2 -концевых доменах этих двух изоферментов. Аутоантигенные эпитопы идентифицированы в средних и С-концевых участках GAD 65. Показано, что повышение титра антител к С-концевым эпитопам GAD 65 связано с риском развития СД1 [8].

Впервые аутоантитела к островковым клеткам поджелудочной железы (islet cell autoantibodies, ICA), **взаимодействующие с антигенами эндокринных клеток островков Лангерганса поджелудочной железы**, описаны более 30 лет назад. ICA являются гетерогенной группой АТ к различным аутоантигенам β -клеток, основную часть которых (до 97 %) составляют GAD, IA-2 и инсулин [1]. ICA определяются у 70–90 % лиц с впервые диагностированным СД1 при манифестации диабета в возрасте до 15 лет, с увеличением возраста заболевания частота встречаемости ICA снижается до 60 % и ниже. Еще ниже частота ICA при манифестации диабета до 5 лет — 21 %. Регистрация позитивных ICA также снижается по мере увеличения длительности СД1. Описано снижение регистрации ICA с 66,7 % у лиц с длительностью СД1 до 1 года, 62,5 % — при длительности диабета от года до 5 лет и до 35,7 % — у лиц с длительностью СД1 более 5 лет [9].

Аутоантитела к инсулину (АТ-И), или **противоинсулиновые антитела** впервые описаны Hirato A. с сотрудниками (1970) у пациентов со спонтанной гипогликемией. Было установлено, что эти антитела являются иммуноглобулинами класса G и **встречаются у больных диабетом, получавших инсулинотерапию** [10]. Патогенетическая роль АТ-И в развитии СД1 была подтверждена обнаружением АТ-И у 18 % больных с впервые диагностированным СД1 Palmer J. и сотрудниками в 1983 [4]. Позднее было доказано, что аутоантитела к инсулину выявляются у 35–60 % пациентов с впервые выявленным СД1 до назначения инсулинотерапии. После начала инсулинотерапии этот тип АТ свидетельствует скорее о реакции на экзогенно вводимый инсулин, чем о возникающем аутоиммунном процессе в β -клетках. Кроме того, АТ-И могут являться маркерами инсулинорезистентности и аллергических реакций на экзогенно вводимый инсулин. Проведенные исследования среди лиц с высокими риском развития СД (генетическая предрасположенность) показали, что около 30 % обследованных являются позитивными в отношении АТ-И [12].

Антитела к декарбоксилазе глютаминовой кислоты (АТ-GAD) — один из типов аутоантител, которые присутствуют у большинства пациентов с СД1, что свидетельствует об аутоиммунном механизме деструкции островкового аппарата поджелудочной железы. АТ-GAD выявляются в 60–90 % случаев при манифестации СД1. Они одними из первых появляются в кровотоке у больных на начальных стадиях сахарного диабета и могут детектироваться у пациентов за 5–7 лет до клинического проявления болезни [13]. По мнению специалистов, АТ-GAD представляют собой высокоинформативный маркер для идентификации предиабета и выявления индивидуумов с высоким риском развития диабета 1 типа.

Клинические проявления СД1 возникают только после того, как разрушается не менее 80 % клеток, секретирующих инсулин [1]. У лиц без диабета с высоким титром этих антител риск возникновения сахарного диабета составляет 9–10 %, а по некоторым данным — до 45 %. Для пациентов с диабетом 2-го типа (инсулиннезависимым) присутствие АТ-GAD может говорить о риске перехода этого заболевания в инсулинозависимый диабет.

Следует учитывать, что АТ-GAD и другие антитела к островковым клеткам могут быть обнаружены и у 1–2 % здоровых лиц, у которых впоследствии не происходит развитие инсулинозависимого сахарного диабета.

Все вышеизложенное позволяет полагать, что изучение молекулярно-генетических механизмов, закономерностей течения СД1 и патогенетической роли различных типов аутоантител является важной фундаментальной и прикладной медико-биологической задачей, так как именно они могут служить основой для разработки новых принципов диагностики, патогенетически обоснованной терапии и профилактики этого заболевания. Для решения этих задач необходимы новые высокочувствительные, специфичные и информативные методы идентификации и количественной детекции различных групп аутоантител, основанные на достижениях современной иммунобиотехнологии и позволяющие не только обнаруживать развитие аутоиммунных нарушений на доклинической стадии (преддиабета), диагностировать СД1 с высоким уровнем чувствительности и специфичности, и тем самым своевременно предотвращать развитие этого заболевания у детей и взрослых, но и контролировать эффективность и целесообразность инсулинотерапии, развитие состояния инсулинорезистентности и прогнозировать течение заболевания и возникновение его осложнений.

Цель работы — разработка метода иммуноферментного анализа аутоантител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты, оценка их клинико-диагностической и патогенетической значимости и обоснование использования этого иммунохимического показателя в качестве маркера СД1 в медицинской практике для целей диагностики, изучения патогенеза и прогнозирования развития аутоиммунного поражения поджелудочной железы при СД1.

Материалы и методы исследования. На основе полученных высокоочищенных компонентов (препаратов декарбоксилазы глютаминовой кислоты и антител к ней) разработан метод иммуноферментного анализа концентрации АТ-GAD в сыворотке крови в формате твердофазного количественного иммуноферментного анализа — ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [11].

Принцип метода заключается в следующем. Анализируемые аутоантитела к GAD класса IgG, находящиеся в сыворотке крови пациентов, связываются с антигеном GAD, предварительно иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшетов для ИФА, с образованием иммунокомплекса. Несвязавшиеся антитела удаляются путем отмывания планшета. На втором этапе к образовавшемуся иммунокомплексу «антиген—антитело» добавляют меченные ферментом (щелочной фосфатазой) моноклональные антитела, специфичные к IgG человека. Индикатором в этом тесте является хромогенный субстрат фермента щелочной фосфатазы — *p*-нитрофенилфосфат. Добавлением стоп-раствора (NaOH) останавливают развитие цветной реакции и спектрофотометрически измеряют ее интенсивность, которая прямо пропорциональна концентрации исследуемых аутоантител к GAD в образце.

Концентрацию АТ-GAD в анализируемых образцах рассчитывают по калибровочному графику, отражающему зависимость значений оптической плотности образцов от концентрации АТ-GAD в калибровочных (стандартных) пробах (рис. 1).

Интерпретация полученных результатов проводилась на основе значений концентраций АТ-GAD: при содержании АТ-GAD в образце выше 1,050 Ед/мл результат считали положительным, а при концентрации АТ-GAD ниже 1 Ед/мл — отрицательным.

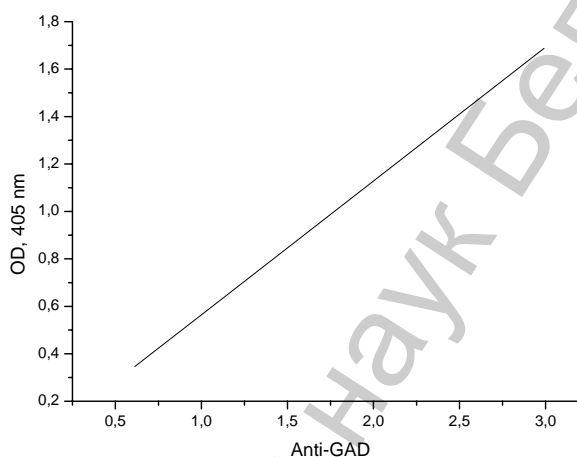


Рис. 1. Калибровочный график, отражающий зависимость концентрации AT-GAD от оптической плотности (по оси абсцисс — концентрация AT-GAD в Ед/мл, по оси ординат — оптическая плотность)

Результаты и их обсуждение. Разработанный метод иммуноферментного анализа аутоантител к глютаматдекарбоксилазе был апробирован на образцах сыворотки крови лиц с СД1 (преддиабетом) с различной степенью выраженности аутоиммунного синдрома, критерием которой служила концентрация противоинсулиновых антител.

Следует заметить, что, по современным воззрениям, концентрация антител к инсулину (АТ-И) в крови может служить маркером степени поражения инсулинсекретирующих клеток поджелудочной железы и выраженности аутоиммунного синдрома [5]. В силу этого нами предварительно была изучена концентрация АТ-И в сыворотке крови лиц с СД1 типа (22 чел.) методом иммуноферментного анализа с помощью ИФА тест-системы (DRG, Германия). У всех обследованных пациентов с СД1 концентрация аутоантител к инсулину была выше нормы (0,95 Ед/мл) и колебалась от 1,15 до 5,22 Ед/мл. Средний уровень АТ-И среди обследованных составил 1,99 Ед/мл.

На основе полученных значений концентраций противоинсулиновых антител в сыворотке крови было сформировано 3 группы лиц: с низким уровнем АТ-И — от 1,15 до 1,85 Ед/мл; средним — 2,20—2,80 Ед/мл и высоким — 3,5—8,5 Ед/мл, в которых затем было проведено изучение концентрации аутоантител к GAD разработанным методом ИФА.

Значение концентраций АТ-GAD в этих группах у больных СД1 с различной степенью поражения инсулинсекретирующих клеток поджелудочной железы представлены на рис. 2.

Как видно на рис. 2, у всех пациентов с СД1 наблюдалось повышение концентрации АТ-GAD в крови по сравнению со здоровыми лицами ($M \pm m$) — $0,64 \pm 0,2$ Ед/мл. При этом обнаружена зависимость концентраций АТ-GAD от степени выраженности аутоиммунного синдрома: средний уровень АТ-GAD в группе 1 (при низких значениях АТ-И) составил $1,46 \pm 0,19$ Ед/мл; в группе 2

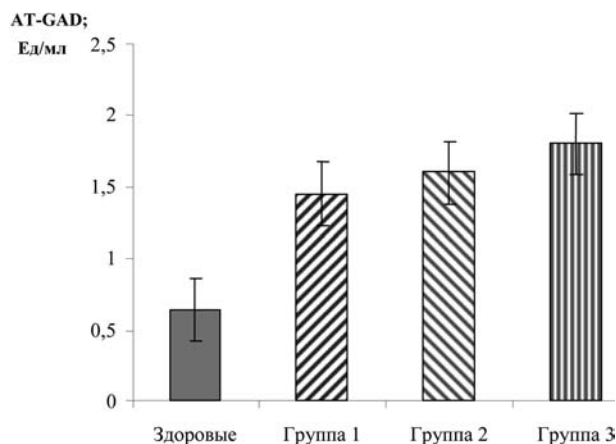


Рис. 2. Концентрация AT-GAD в сыворотке крови здоровых лиц и у пациентов на различных стадиях СД 1 ($M \pm m$): группа 1 — содержание антиинсулиновых антител 1,15—1,85 Ед/мл; группа 2 — содержание антиинсулиновых антител 2,20—2,80 Ед/мл; группа 3 — содержание антиинсулиновых антител 3,5—8,5 Ед/мл

(средний уровень AT-И) — $1,6 \pm 0,23$ Ед/мл; в группе 3 (высокий уровень AT-И) — $1,8 \pm 0,22$ Ед/мл; т. е. уровень антител к GAD у 95 % пациентов с СД1 был выше порогового значения — 1,050 Ед/мл. Выявленное повышение уровня AT-GAD свидетельствует об аутоиммунной интервенции, сопровождающей развитие СД1 на различных стадиях аутоиммунного процесса.

Кроме того, с помощью разработанного метода иммуноферментного анализа AT-GAD в сыворотке крови были изучены концентрации антител к декарбоксилазе глютаминовой кислоты у здоровых лиц (15 чел.) и в модельных образцах, содержащих различные известные концентрации AT-GAD.

При содержании AT-GAD в образце выше 1,050 Ед/мл результат считали положительным, а при концентрации AT-GAD ниже 1 Ед/мл — отрицательным. Полученные результаты по определению AT-GAD у здоровых лиц представлены в табл. 1.

Таблица 1. Концентрация AT-GAD в сыворотке крови здоровых лиц

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Концентрация AT-GAD; Ед/мл	0,66	0,48	1,17	0,49	0,24	0,70	0,59	1,19	0,50	0,69	0,48	0,66	0,49	0,52	0,69

Как видно из данных табл. 1, средняя концентрация AT-GAD в сыворотке крови здоровых лиц составила $0,64 \pm 0,2$ Ед/мл. При этом из 15 обследованных здоровых лиц в 90 % случаев результат определения AT-GAD был отрицательным (ниже 1 Ед/мл), а у 10 % обследуемых — положительным (выше 1,050 Ед/мл), что, с одной стороны, согласуется с результатами исследований других авторов [7] и современными представлениями о содержании AT-GAD у здоровых лиц, а с другой — свидетельствует о пригодности разработанной тест-системы для количественного определения AT-GAD в сыворотке крови.

Результаты по изучению содержания AT-GAD в 3 модельных образцах сыворотки крови, содержащих различные известные концентрации AT-GAD, с помощью разработанного метода представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Концентрация AT-GAD в модельных образцах, содержащих известные концентрации AT-GAD

	Известные концентрация AT-GAD в модельных образцах, Ед/мл	Концентрация AT-GAD, измеренная с помощью разработанной ИФА-системы, Ед/мл ($M \pm m$)
Образец 1	1,15	$1,12 \pm 0,002$
Образец 2	3,00	$2,98 \pm 0,004$
Образец 3	0,65	$0,59 \pm 0,001$

Как видно из данных табл. 2, полученные результаты сопоставимы с заложенной концентрацией AT-GAD в образцах и свидетельствуют о пригодности разработанного метода для количественного определения AT-GAD в сыворотке крови. При этом особую важность представляет выявление AT-GAD на начальных стадиях развития диабета (предиабетический период), когда проявления клинической симптоматики практически отсутствуют. Именно в этот период обнаружение AT-GAD позволяет оценить риск развития СД1, диагностировать начальные стадии аутоиммунного поражения поджелудочной железы и СД1 и тем самым обосновывает применение соответствующих лечебно-профилактических мероприятий.

Таким образом, полученные результаты обосновывают целесообразность использования нового разработанного высокочувствительного метода иммуноферментного анализа для оценки концентрации AT-GAD в крови как информативного количественного клинико-диагностического и патогенетического маркера СД1. В конечном итоге исследователям предоставляется возможность использования точного количественного критерия (значение концентрации AT-GAD) для диагностики СД1 уже на ранних стадиях аутоиммунных нарушений в организме, оценки степени выраженности патологического процесса, контроля эффективности проводимой терапии и прогнозирования течения заболевания.

Выводы. Разработана методология иммуноферментного анализа концентрации AT-GAD в сыворотке крови в формате твердофазного ELISA.

Изучены концентрации AT-GAD у здоровых лиц и в модельных образцах, содержащих известные концентрации AT-GAD. У 90 % обследованных здоровых лиц результат определения AT-GAD был отрицательным, а у 10 % — положительным (пороговые концентрации), что согласуется с мнениями других исследователей и современными представлениями о содержании AT-GAD в организме.

У больных СД1 с различной степенью поражения инсулинсекретирующих клеток поджелудочной железы обнаружено повышение концентрации AT-GAD и зависимость его от степени выраженности аутоиммунного синдрома, что свидетельствует о наличии аутоиммунной интервенции, присущей СД1.

Полученные результаты обосновывают целесообразность использования в медицинской практике иммуноферментного анализа AT-GAD как высоко-

информативного и чувствительного клинико-диагностического, патогенетического и прогностического маркера СД1.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор № X08—122).

Литература

1. Мохорт Т. В. Сахарный диабет I типа: эпидемиология, основы этиопатогенеза и профилактики. Минск, 2004. — 143 с.
2. Пивень Н. В. // Сб. науч. тр. «Биорегуляторы: исследование и применение». Минск, 2008. Вып. 2. С. 78—83.
3. Сухарева Б. С. // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 131—162.
4. Achenbach P. // Diabetes. 2004. Vol. 53. P. 384—392.
5. Gilliam L. K., Palmer J. P., Lernmark A. // Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text. Philadelphia, 2004. P. 499—518.
6. Graham J. // Diabetes. 2002. Vol. 51. P. 1346—1355.
7. Horru S. // Clin. Exp. Immunol. 2004. Vol. 136. P. 120—128.
8. Kimpimaki T. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002. Vol. 87. P. 4572—4579.
9. Knip M. // Horm. Res. 2002. Vol. 57. P. 6—11.
10. Koczwara K., Bonifacio E., Ziegler A. G. // Diabetes. 2004. Vol. 53. P. 1—4.
11. Krischer J. P. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003. Vol. 88. P. 103—108.
12. Notkins A. L., Lernmark A. // J. Clin. Invest. 2001. Vol. 108. P. 1247—1252.
13. Ziegler A. G. // JAMA. 2003. Vol. 290. P. 1721—1728.

N. V. PIVEN, E. E. ORLOVA, L. N. LUCHVERCHYK

IMMUNOENZYME ASSAY OF AUTOANTIBODIES TO GLUTAMATIC ACID DECARBOXYLASE — A MARKER OF DIABETES MELLITUS

Summary

In the paper there are presented data on autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) — highly informative diagnostic and pathogenetic marker of insulin-dependent diabetes mellitus (type I diabetes), presence of which in the blood could be revealed months and years before the appearance of the first clinical symptoms of type I diabetes. The authors have elaborated a new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which approbation has been performed on the clinical material. It is substantiated the use expediency of ELISA of autoantibodies to GAD concentrations as clinical-diagnostic, pathogenetic and prognostic marker of type I diabetes at different stages in children and adults.

УДК 577.344 + 577.355

Н. В. КОЗЕЛ, В. П. ДОМАНСКИЙ, Н. В. ШАЛЫГО

**АКТИВНОСТЬ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА
И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ
ТАБАКА С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ
АСКОРБАТПЕРОКСИДАЗЫ
ПРИ ФОТООКСИЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 25.01.2010)

Установлено, что растения табака, трансформированные смысловым геном аскорбатпероксидазы, в условиях фотоокислительного стресса, индуцированного сенсibilизатором бенгальским розовым, характеризуются меньшей степенью деструкции структурных белков фотосистемы 2, меньшей степенью нарушения распределения энергии между фотосистемами и меньшей степенью подавления активности фотосистемы 2, что обусловлено эффективной детоксикацией активных форм кислорода за счет более высокого антиоксидантного статуса таких растений. Высказано предположение о том, что растения, трансформированные смысловым геном аскорбатпероксидазы, будут более устойчивы к любому виду окислительного стресса, при котором в клетках растений накапливается пероксид водорода.

Введение. В образовании различных активных форм кислорода (АФК) в клетках растительных организмов большое значение имеют кислородзависимые фотосенсибилизированные реакции (фотодинамические), которые протекают, как правило, с участием долгоживущего триплетного состояния фотосенсибилизатора — молекулы-красителя, инициирующей эти реакции [1]. Стресс, вызванный светозависимым образованием АФК в биологических системах, называют фотоокислительным [2]. Потенциальная опасность развития фотоокислительного стресса в растительном организме связана с тем, что клетки растений богаты пигментами-сенсibilизаторами (хлорофиллы (Хл), каротиноиды, флавины и др.), способными генерировать на свету АФК, а также существует вероятность накопления при неблагоприятных условиях в клетках предшественников Хл — порфиринов, обладающих фотодинамической активностью [3].

Наряду с молекулярным синглетным кислородом при фотоокислительном стрессе в клетках растений образуется и пероксид водорода (H_2O_2) [4]. Сам пероксид водорода не представляет существенной опасности для раститель-

ной клетки, однако он является основным источником образования гидроксильного радикала — высокотоксичной АФК, повреждающей биологически важные молекулы. Стратегия защиты клеток от действия гидроксильного радикала направлена на утилизацию его предшественника — H_2O_2 . Уровень H_2O_2 в клетках растений контролируют два фермента — каталаза и аскорбатпероксидаза (АПР), однако ключевая роль в разрушении H_2O_2 принадлежит АПР [5]. Трансформация растений смысловым геном АПР позволяет повысить содержание этого фермента, что, в свою очередь, может увеличить устойчивость растений к фотодинамическому воздействию, при котором в клетках растений наряду с другими активными формами кислорода возрастает и уровень H_2O_2 [4].

Подобные исследования с использованием растений с измененным геномом в последнее время широко распространены, что обусловлено возможностью повышения с их помощью продуктивности сельскохозяйственного производства в условиях возросшей за последние годы уязвимости растений к окислительным процессам, вызванным неблагоприятными факторами окружающей среды. Так, известно, что растения с повышенной экспрессией антиоксидантных ферментов более устойчивы к абиотическому стрессу [6; 7]. Однако изучение механизмов устойчивости таких растений к окислительному и, в частности, фотоокислительному стрессу находится на начальной стадии. Использование фотодинамического воздействия для индукции окислительного стресса является удобной моделью для изучения механизмов антиоксидантной защиты в растительной ткани. В связи с этим большой теоретический и практический интерес представляет исследование особенностей фотодинамических процессов, индуцированных красителем-сенсibilизатором, в растениях табака, трансформированных смысловым геном АПР.

Цель работы — выявление особенностей влияния красителя-сенсibilизатора бенгальского розового (БР) на функциональную активность и структурные белки наиболее чувствительного к стрессовым воздействиям звена фотосинтетического аппарата — фотосистемы (ФС) 2, на распределение энергии между ФС, а также на активность в таких условиях фермента АПР и содержание низкомолекулярного антиоксиданта аскорбата в растениях табака, трансформированных смысловым геном АПР.

Объекты и методы исследования. В опытах использовали 45-дневные, не достигшие стадии бутонизации, растения табака (*Nicotiana tabacum* cv SNN), трансформированные смысловым геном АПР (линии APX4), и растения дикого типа (ДТ), выращенные в пластмассовых емкостях в грунте «Восторг» под люминесцентными лампами SL 40/765 в режиме 14 ч света (интенсивность $160 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) и 10 ч темноты при температуре $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 50–60 %. Фотоокислительные процессы инициировали с помощью ксантенового красителя-сенсibilизатора БР [8]. Для этого высечки четвертого листа растений ДТ и трансгенных растений инфильтрировали 100 мкМ водным раствором БР, после чего тщательно промывали, помещали в дистиллированную воду и освещали в течение 24 ч (интенсивность $160 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$). Контролем служили высечки опытных и контрольных растений табака, инфильтрированные водой. Семена

трансформантов были любезно предоставлены профессором Б. Гриммом (Берлинский университет им. А. Гумбольдта).

Спектры низкотемпературной флуоресценции (77 К) листьев табака регистрировали с помощью монохроматора МДР-3 (Россия) при спектральной ширине щели 2 нм со светофильтром ОС-13. При этом использовали фотоумножитель ФЭУ-38. Для возбуждения флуоресценции выделяли полосу 440 нм из свечения лампы ДКСШ-1000 с помощью монохроматора SPM-2 (Германия) со спектральной шириной щели 6 нм и светофильтром СС-5 [9].

Оценку функциональной активности ФС2 проводили с помощью метода индукции флуоресценции Хл [10]. Для регистрации кривых индукции флуоресценции Хл использовали флуоресцентную установку, созданную в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», которая описана в работе [11].

Для количественного определения белков ФС2 использовали метод иммуноблоттинга. Белки экстрагировали из свежей растительной ткани (0,1 г) в 0,5 мл буфера для экстракции, который содержал 56 мМ дитиотрейтола, 56 мМ Na_2CO_3 , 2 мМ ЭДТА, 12 % сахарозы и 2 % SDS-Na. **Разделение белков осуществляли применяя метод денатурирующего гельэлектрофореза, используя 12 %-ный разделяющий и 4 %-ный концентрирующий полиакриламидные гели.** Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Hybond-C pure» (Amersham, США) с порами 0,45 мкм. Для проведения иммуноблоттинга использовали раствор TBS, содержащий 10 мМ Трис-НСl pH 7,5 и 0,15 М NaCl, а также раствор TBST, в состав которого входил также 0,05 % Tween 20. Нитроцеллюлозную мембрану с белками инкубировали в течение 1 ч в 50 мл TBST в присутствии 4 % сухого молока, промывали 15 мин в TBST (без сухого молока) и инкубировали в течение 1 ч с первичными антителами на белки Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb5 и D1, растворенными в TBS, в присутствии 5 % сухого молока. Затем мембрану промывали в TBST в течение 30 мин и инкубировали со вторичными антителами в течение 1 ч, после чего мембрану снова промывали в течение 30 мин в TBST. **На последней стадии мембрану кратковременно (1–2 мин) инкубировали с буфером для щелочной фосфатазы, содержащим 100 мМ Трис-НСl pH 9,5, 100 мМ NaCl и 5 мМ MgCl_2 .** Проявляли мембрану в темноте в 25 мл буфера для щелочной фосфатазы в присутствии 10 мг NBT (p-nitro blue tetrazolium chloride), растворенного в 200 мкл 70 %-го N, N-диметилформаида, и 5 мг BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), растворенного в 400 мкл дистиллированной воды [12]. Количество белков рассчитывали в относительных единицах по площади и интенсивности полос после их визуализации, используя программу TotalLab 2.01.

Для количественного определения общего и восстановленного аскорбата 0,5 г растительного материала растирали до гомогената на холоду в 5 %-ной сульфосалициловой кислоте. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g, а затем проводили нейтрализацию супернатанта 5 М NaOH до pH 6,0. Для определения общего аскорбата к 200 мкл нейтрализованного экстракта добавляли 50 мкл 10 мМ дитиотрейтола и 50 мкл 40 мМ раствора N-этилмалеимида, а для определения восстановленного аскорбата к такому же объему нейтрализованного экстракта приливали 100 мкл дистиллированной воды. Затем к рас-

творам, содержащим как общий, так и восстановленный аскорбат, последовательно добавляли 200 мкл 10 %-ной ТХУ, 200 мкл 44 %-ной ортофосфорной кислоты, 200 мкл 4 %-го 2,2'-дипиридила и 100 мкл 3 %-го раствора FeCl_3 . Контрольная проба вместо экстракта содержала разбавленный К-Na-фосфатный буфер (рН 7,4) и проходила такую же обработку, как и опытные образцы. Все пробы инкубировали 60 мин при 30 °С, после чего проводили их спектрофотометрический анализ при длине волны поглощаемого света 524 нм. Концентрацию аскорбата определяли, используя молярный коэффициент поглощения $\varepsilon = 8,7 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [13].

Для определения активности АПР использовали реакцию восстановления пероксида водорода аскорбатом, катализируемую АПР [13]. Для получения грубого ферментного препарата АПР 0,5 г растений гомогенизировали в 4 мл охлажденного 50 мМ К-Na-фосфатного буфера (рН 7,8), содержащего 1 мМ ЭДТА и 10 мМ аскорбата натрия. Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин при 4 °С. Активность АПР определяли по кинетике потребления аскорбата, регистрируя изменение оптической плотности при 290 нм в течение 20 сек ($\varepsilon = 2,8 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). Реакционная среда содержала 50 мМ К-Na-фосфатный буфер (рН 7,0), 1 мМ ЭДТА, 1 мкМ H_2O_2 и 50 мкл грубого ферментного препарата. Содержание белка определяли по методу Bradford [14], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Во всех экспериментах использовали реактивы фирмы «Sigma» (США), а также в некоторых случаях реактивы аналитической чистоты других производителей и антитела фирмы «Agriser» (Швеция). Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре Uvikon 931 фирмы «Kontron» (Германия), флуориметрические анализы осуществляли с помощью спектрофлуориметра Solar CM 2203 (Беларусь), электрофорез проводили на установке Amersham (США). Все данные представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения, вычисленные из трех независимых опытов. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 10.0.

Результаты и их обсуждение. Ранее мы показали [15], что растения табака линии АРХ4, трансформированные смысловым геном АПР, обладают практически в 2 раза большей активностью этого фермента по сравнению с растениями ДТ. В работе [16] нами были представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что при инфильтрации высечек из листьев трансгенных растений и растений ДТ в них накапливается одинаковое количество сенсibilизатора. В то же время в условиях фотоокислительного стресса, индуцированного БР, трансгенные растения накапливали меньшее количество АФК (на 35 %) по сравнению с растениями ДТ. При этом растения-трансформанты характеризовались меньшей степенью деструкции фотосинтетических пигментов — Хл ($a + b$) и каротиноидов (на 14 и 16 % соответственно), а также менее выраженным нарушением барьерных свойств мембран по отношению к растениям ДТ.

Повышенная устойчивость Хл и каротиноидов — компонентов фотосинтетических мембран — в трансгенных растениях при фотодинамическом воздействии может приводить к сохранению высокой функциональной активности фотосинтетического аппарата. С помощью спектральных методов мы

изучили состояние и функционирование фотосинтетического аппарата в листьях трансгенных растений табака в условиях фотоокислительного стресса. Для этого были использованы два подхода — регистрация спектров флуоресценции листьев табака при температуре жидкого азота и метод индукции флуоресценции Хл.

Анализ спектров низкотемпературной флуоресценции показал, что в спектре флуоресценции зеленых листьев табака контрольных и опытных вариантов регистрируются два максимума — при 686 и 732 нм, а также плечо в области 695 нм. После 4 ч инкубации на свету высечек листьев табака ДТ и линии АРХ4, инфильтрированных БР, спектральные характеристики не изменялись по сравнению с высечками листьев, инфильтрированных водой. При более длительном освещении (8 и 24 ч) положение основных максимумов ФС2 при 686 и 695 нм и ФС1 при 732 нм для опытных растений не изменилось по сравнению с контролем. При этом было зарегистрировано существенное уменьшение отношения интенсивности флуоресценции при 732 нм к интенсивности флуоресценции при 686 нм в листьях табака ДТ, инфильтрированных БР. Так, соотношение интенсивностей полос при 732 и 686 нм в варианте дикий тип + БР после 8 ч освещения высечек снижалось с 4,0 до 2,3 (рис. 1), что является результатом изменения в распределении энергии возбуждения между ФС. Фотосинтетический аппарат растений, трансформированных смысловым геном АПР, был в меньшей степени подвержен фотодинамическому воздействию. На это указывает тот факт, что соотношение интенсивностей полос при 732 и 686 нм уменьшилось с 4,0 только до 3,2.

С помощью метода индукции флуоресценции Хл показано, что через 4 ч освещения высечек листьев табака, инфильтрированных сенсibilизатором, в них были выявлены существенные изменения функциональной активности ФС2. Как в растениях ДТ, так и в трансгенных растениях, инфильтрированных БР, максимальный уровень флуоресценции Хл F_m , а также потенциаль-

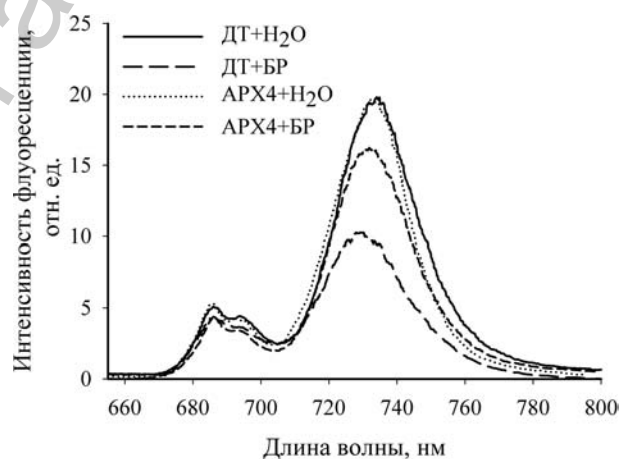


Рис. 1. Спектры низкотемпературной флуоресценции после 8 ч освещения зеленых листьев трансгенных растений табака (АРХ4) и растений ДТ, инфильтрированных 100 мкМ БР или водой. Длина волны возбуждения — 440 нм

ный квантовый выход фотохимических реакций ФС2 ($\Phi_{\text{ФС2}}$) снижался по сравнению с растениями, инфильтрированными водой. Однако уровень F_m и значение $\Phi_{\text{ФС2}}$ в растениях ДТ, обработанных БР, были ниже по сравнению с этими показателями для растений-трансформантов, инфильтрированных сенсбилизатором (табл. 1). Потенциальный квантовый выход фотохимических реакций ФС2 ($\Phi_{\text{ФС2}}$) для контрольных растений, инфильтрированных водой, был 0,71, а для растений, трансформированных смысловым геном АПР, и растений ДТ, инфильтрированных БР, — 0,58 и 0,39 соответственно. Важно отметить, что при 4- и 8-часовом освещении темновой уровень флуоресценции Хл F_0 в условиях стресса возрастал, причем преимущественно для растений ДТ, что указывает на увеличение в них числа Q_B -невосстанавливающих реакционных центров (РЦ). Снижение уровня F_m может быть следствием нарушения распределения энергии в светособирающей матрице ФС2. При дальнейшем освещении наблюдали тенденцию к снижению активности ФС2 преимущественно в растениях ДТ, инфильтрированных БР, что проявлялось в еще большем уменьшении уровня F_m и значения $\Phi_{\text{ФС2}}$ (табл. 1) по сравнению с контрольными вариантами. Как уже отмечалось, при освещении в растениях табака в условиях окислительного стресса происходит деструкция фотосинтетических пигментов, что, наряду со снижением эффективности распределения энергии, может быть дополнительным фактором нарушения функционирования ФС2. Существенная фотодеструкция пигментов в растениях ДТ после 24 ч освещения объясняет также снижение к этому времени уровня F_0 по отношению к контролю для таких растений (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Параметры индукции флуоресценции Хл после 4, 8 и 24 ч освещения зеленых листьев трансгенных растений табака (АРХ4) и растений ДТ, инфильтрированных 100 мкМ БР или водой

Время освещения	Вариант	F_0	F_m	$\Phi_{\text{ФС2}}$
4 ч	ДТ + H ₂ O	7,4	25,1	0,71
	ДТ + БР	8,2	13,5	0,39
	АРХ4 + H ₂ O	7,6	28,7	0,74
	АРХ4 + БР	7,9	19,0	0,58
8 ч	ДТ + H ₂ O	7,9	26,4	0,70
	ДТ + БР	10,5	14,4	0,24
	АРХ4 + H ₂ O	7,5	28,9	0,74
	АРХ4 + БР	8,2	20,3	0,60
24 ч	ДТ + H ₂ O	8,7	24,5	0,65
	ДТ + БР	8,0	8,1	0,01
	АРХ4 + H ₂ O	8,8	24,7	0,64
	АРХ4 + БР	8,9	16,3	0,45

Для выяснения механизмов, определяющих более высокую функциональную активность ФС2 растений-трансформантов при фотодинамическом воздействии, был проведен анализ содержания основных структурных белков светособирающих комплексов (ССК) ФС2 — Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhcb5, и белка РЦ ФС2 — D1. Методом иммуноблоттинга была выявлена фотодеструкция

белка Lhcb5 внутренней антенны ФС2, а также белка D1 при освещении высечек листьев табака, инфильтрированных БР, как в трансгенных растениях, так и в растениях ДТ по сравнению с растениями, инфильтрированными водой. При этом степень деструкции этих белков в растениях ДТ, обработанных БР, была выше по сравнению с этими показателями для растений-трансформантов, инфильтрированных сенсibilизатором. Так, содержание белков Lhcb5 и D1 в растениях ДТ, инфильтрированных БР, составило (в относительных единицах) 1,47 и 1,35 соответственно, в то время как в трансгенных растениях в таких условиях уровень Lhcb5 составил 2,57, а D1 — 4,10 (табл. 2). Фотодеструкции белков Lhcb1 и Lhcb2 внешней антенны ФС, а также белка Lhcb3 внутренней антенны ФС2 выявлено не было (табл. 2). Видимо, деградация белка Lhcb5, входящего в состав ССК ФС2, и определяет нарушение перераспределения энергии в светособирающей антенне ФС2, а обнаруженная фотодеструкция белка D1 объясняет увеличение числа неактивных комплексов ФС2.

Т а б л и ц а 2. Содержание структурных белков ФС2 после 24 ч освещения зеленых листьев трансгенных растений табака (АРХ4) и растений ДТ, инфильтрированных 100 мкМ БР или водой

Белок ФС2	Вариант			
	ДТ + Н ₂ О	ДТ + БР	АРХ4 + Н ₂ О	АРХ4 + БР
Белок, отн. ед.				
Lhcb1	13,64 ± 0,71	13,82 ± 0,28	14,40 ± 0,24	14,37 ± 0,43
Lhcb2	12,22 ± 0,35	13,37 ± 0,44	12,42 ± 0,51	12,61 ± 0,65
Lhcb3	0,75 ± 0,03	0,73 ± 0,01	0,71 ± 0,10	0,79 ± 0,04
Lhcb5	8,95 ± 0,34	1,47 ± 0,17	8,21 ± 0,23	2,57 ± 0,39
D1	8,72 ± 0,43	1,35 ± 0,18	8,34 ± 0,27	4,10 ± 0,09

Резюмируя результаты по изучению активности ФС2 — одного из наиболее чувствительных участков ФС — в условиях фотоокислительного стресса, отметим, что растения табака, трансформированные смысловым геном АПР, обладают более высокой устойчивостью ФС2 к фотодинамическому воздействию, индуцированному БР, по сравнению с растениями ДТ.

Устойчивость растительного организма к окислительному стрессу, и к фотоокислительному в частности, определяется функционированием антиоксидантной системы растения [6; 7; 17]. Благодаря гибкому механизму регуляции антиоксидантного статуса растительной клетки, выработанному в процессе эволюции, в растениях эффективно разрушаются АФК, накопившиеся в избыточном количестве, и удаляются токсичные продукты их реакций. Однако при чрезмерном накоплении АФК в клетках растений антиоксидантная система из-за истощения уровня низкомолекулярных антиоксидантов или ингибирования антиоксидантных ферментов может не справляться с детоксикацией этих АФК и продуктов их реакций, что в конечном итоге может привести к гибели растительного организма.

Анализ активности антиоксидантного фермента АПР показал, что в условиях фотоокислительного стресса как в растениях ДТ, так и в трансгенных

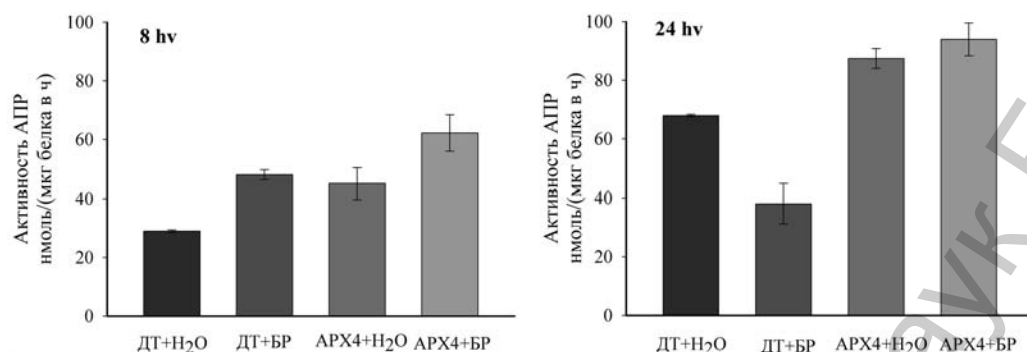


Рис. 2. Активность АПР после 8 и 24 ч освещения зеленых листьев трансгенных растений табака (АРХ4) и растений ДТ, инфильтрированных 100 мкМ БР или водой

растениях после 8 ч освещения увеличивается активность АПР, причем активность фермента в растениях-трансформантах была существенно выше и в контроле и в опыте по сравнению с растениями ДТ (рис. 2). Так, в высечках трансгенных растений, инфильтрированных водой, после 8 ч освещения активность АПР на 55 % превышала этот показатель для растений ДТ, а в инфильтрированных БР — на 30 % по сравнению с высечками из листьев растений ДТ, содержащими БР. При дальнейшем освещении (24 ч) наблюдали снижение на 45 % активности АПР в высечках растений ДТ, инфильтрированных БР, по сравнению с контролем. В то же время в стрессовых условиях была зафиксирована более высокая активность фермента в высечках из листьев трансгенных растений (на 10 %) по сравнению с высечками из этих же листьев, инфильтрированных водой.

Установлено, что трансгенные растения, инфильтрированные водой, характеризуются более высоким уровнем (примерно на 30 %) общего и восстановленного аскорбата по отношению к растениям ДТ, также инфильтрированным

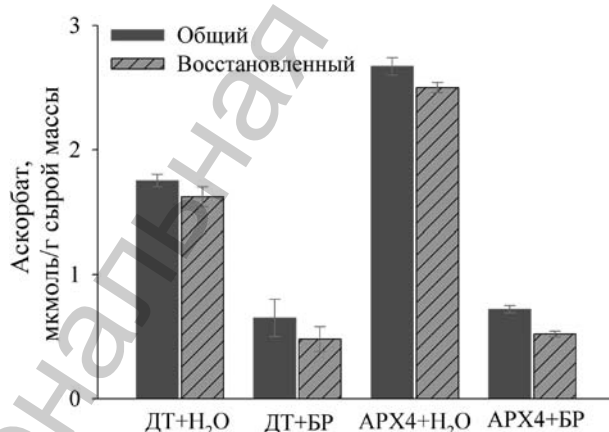


Рис. 3. Содержание общего и восстановленного аскорбата после 8 ч освещения зеленых листьев трансгенных растений табака (АРХ4) и растений ДТ, инфильтрированных 100 мкМ БР или водой

водой (рис. 3). Однако в условиях фотоокислительного стресса это различие нивелируется, что, видимо, обусловлено более интенсивным потреблением аскорбата в растениях, трансформированных смысловым геном АПР. Интенсивное потребление аскорбата при стрессе в трансгенных растениях, обладающих повышенной активностью АПР, может быть связано с тем, что аскорбат является субстратом для реакции, катализируемой АПР. При этом важно отметить, что в условиях фотоокислительного стресса трансгенные растения характеризовались меньшей степенью накопления в них АФК по сравнению с растениями ДТ, что было показано нами ранее [16].

Заключение. Таким образом, отмечено, что в трансгенных растениях табака, трансформированных смысловым геном АПР, при фотодинамическом воздействии регистрируется высокая активность одного из основных антиоксидантных ферментов растительной клетки АПР, а также интенсивное потребление низкомолекулярного антиоксиданта аскорбата. Полученные данные указывают на активное функционирование антиоксидантной системы в трансгенных растениях по сравнению с растениями ДТ, следствием чего является эффективная детоксикация АФК в растениях-трансформантах. Поддержание низкого содержания АФК в растениях, трансформированных смысловым геном АПР, определяет меньшую степень деструкции в таких растениях фотосинтетических пигментов — Хл и каротиноидов, выявленную нами ранее [16], а также структурных белков ФС, что является фактором сохранения высокой активности фотосинтетического аппарата при фотоокислительном стрессе.

Полученные данные по снижению степени фотоокислительных процессов в трансгенных растениях табака выглядят весьма перспективными с практической точки зрения, так как они показывают целесообразность трансформации сельскохозяйственных культур смысловыми генами ферментов-антиоксидантов, в частности АПР, для повышения устойчивости таких культур к абиотическому стрессу, при котором в клетках растений накапливается пероксид водорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б07М-157).

Литература

1. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М., 2006. — 287 с.
2. Foyer C. H., Lelandais M., Kunert K. J. // *Physiol. Plantarum*. 1994. Vol. 92, N 4. P. 696–717.
3. Красновский А. А., мл. // *Журн. всесоюз. хим. об-ва*. 1986. Т. XXI, № 6. С. 562–567.
4. Шалыго Н. В. // *Вестн. НАН Беларуси. Сер. биол. наук*. 1999. № 3. С. 63–67.
5. Asada K. // *Plant Physiol*. 2006. Vol. 141. P. 391–396.
6. Apel K., Hirt H. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55, N 1. P. 373–399.
7. Lee S. H. et al. // *J. Plant Physiol*. 2007. Vol. 164, N 12. P. 1626–1638.
8. Knox J. P., Dodge A. D. // *Plant Sci. Letters*. 1984. Vol. 37. P. 3–7.
9. Доманский В. П., Самойленко А. Г., Лис П. И. // *Вестн. НАН Беларуси. Сер. биол. наук*. 1986. № 5. С. 100–103.
10. Корнеев Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофилла. Киев, 2002. — 188 с.

11. Доманский В. П., Мананкина Е. Е. // Докл. НАН Беларуси. 2006. Т. 50, № 1. С. 66–69.
12. Jansson S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1320, N 3. P. 297–309.
13. Nakano Y., Asada K. // Plant Cell Physiol. 1981. Vol. 22, N 5. P. 867–880.
14. Bradford M. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
15. Козел Н. В., Шалыго Н. В. // Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Современные проблемы генетики». Минск, 2003. С. 227.
16. Козел Н. В., Шалыго Н. В. // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2009. № 1. С. 97–100.
17. Shigeoka S. et al. // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53, N 372. P. 1305–1319.

N. V. KOZEL, V. P. DOMANSKII, N. V. SHALYGO

**PHOTOSYNTHETIC APPARATUS ACTIVITY AND ANTIOXIDANT SYSTEM CONDITION
IN TOBACCO PLANTS WITH OVEREXPRESSION OF ASCORBATE PEROXIDASE
UNDER PHOTOOXIDATIVE STRESS**

Summary

The features of influence of dye-sensitizer Rose Bengal (RB) on the functional activity and structural organization of photosystem (PS) 2 in gene modified tobacco plants were revealed. Under the photooxidative stress induced by sensitizer RB a destruction of the structural proteins of the PS2, a disturbance of a distribution of the energy between the PS1 and the PS2 as well as inhibition of the PS2 activity were less in the tobacco plants transformed by sense gene of ascorbate peroxidase than in the control plants. This is caused by effective detoxification of the reactive oxygen species in transgenic tobacco plants that have higher the antioxidant status as compared to the control. It has been suggested the assumption that tobacco plants transformed by sense gene of ascorbate peroxidase will be more resistant to any abiotic stress accompanying by accumulation of hydrogen peroxide.

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СВЯЗИ

ПРОТОКОЛ

по результатам переговоров Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований и Вьетнамской академии наук и технологий

В период со 2 по 3 декабря 2009 г. состоялись переговоры представителей Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (БРФФИ) и Вьетнамской академии наук и технологий (ВАНТ).

В процессе переговоров Стороны обсудили состояние сотрудничества в рамках Соглашения БРФФИ и ВАНТ и Положения о конкурсах. С удовлетворением было констатировано, что сотрудничество в рамках уже финансирующихся проектов (конкурсы 2008 и 2009 гг.) осуществляется успешно. Каждая из Сторон выполняет запланированные объемы исследований. Интенсивно происходит обмен опытом и информацией о результатах исследований, их совместный анализ, обмен визитами с целью проведения экспериментальных работ, ознакомления с выполнением партнерской части проекта и подготовки совместных публикаций. Финансирование осуществляется в оговоренные сроки.

В ходе переговоров были обсуждены предложения по плану мероприятий на 2010—2012 гг. с целью успешной реализации Соглашения и укрепления двусторонних контактов.

Стороны считают необходимым:

по результатам совместной экспертизы поданных заявок отобрать для финансирования 10 проектов в рамках конкурса «БРФФИ–ВАНТ-2010» (перечень в приложении);

объявить в январе 2010 г. конкурс «БРФФИ–ВАНТ-2011» с окончательным сроком подачи заявок 15 мая 2010 г.;

в рамках конкурса «БРФФИ–ВАНТ-2011» в 2010 г. организовать экспертизу представленных заявок с последующим совместным решением о финансировании отобранных проектов, начиная с 2011 г.;

проработать возможность проведения в 2010—2011 гг. совместного двухстороннего научного семинара по результатам выполненных проектов.

Протокол подписан в г. Ханое 3 декабря 2009 г. в двух экземплярах на русском языке.

**За Белорусский республиканский
фонд фундаментальных
исследований**

Председатель Научного совета БРФФИ
академик

В. А. Орлович

**За Вьетнамскую академию
наук и технологий**

Президент

Тьяу Ван Минь

БРФФИ — DFG

11—12 февраля 2010 г. Национальная академия наук Беларуси и Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований принимали делегацию Немецкого научно-исследовательского сообщества (DFG) в лице руководителя представительства DFG в Российской Федерации Йорна Ахтерберга и руководителя программы сотрудничества DFG со странами Восточной, Центральной Европы и СНГ Кристиана Шайха.

Представители Немецкого сообщества прибыли для проведения переговоров о перспективах сотрудничества с БРФФИ и презентации для белорусских ученых своего сообщества и программ международного сотрудничества.

Немецкое научно-исследовательское сообщество — одна из ведущих организаций науки Германии, главной задачей которой является поддержка развития науки посредством финансирования научных исследований при университетах и государственных научно-исследовательских институтах. DFG представляет собой национальное сообщество 96 членов: крупнейших университетов, научных обществ Макса Планка, Геймгольца, Гумбольдта, Фраунгоферовского общества и академий наук. Бюджет сообщества в 2009 г. составил 2,7 млрд евро, 60 % из которого — федеральные средства, а 30 % — региональные (земельные).

Основу поддержки научных исследований, оказываемой Немецким научно-исследовательским сообществом, составляет финансирование индивидуальных научных проектов. В финансирование проектов такого рода входит предоставление средств на персонал, научно-исследовательское оборудование, расходные материалы, мобильность, публикации и другие потребности того или иного научно-исследовательского проекта.

Особое внимание уделяется поддержке молодых ученых, для которых разработаны целый ряд программ, направленных на активное вовлечение начинающих исследователей в выполнение научных проектов. Немецкое научно-исследовательское сообщество предоставляет финансирование для участия в кратких научно-технических курсах или в научных летних «школах» в Германии и за рубежом, нацеленных на изучение новых направлений научных исследований и методов, применяемых только за границей ФРГ, что служит обеспечению теоретической и практической подготовки молодых ученых по той или иной актуальной тематике.

DFG создает научные сети между учеными. Такие сети обращены, прежде всего, к молодым ученым в области социально-гуманитарных наук с целью предоставить им возможность осуществлять межрегиональный тематически и проблемно-ориентированный обмен. Научная сеть состоит из постоянного круга лиц, которые длительный период времени — до трех лет — занимаются определенной тематикой. В этот круг могут входить ученые, работающие за границей, таким образом научные сети служат также вовлечению молодых ученых-гуманитариев из различных стран в международное сотрудничество.

DFG оказывает финансовую поддержку научной инфраструктуры: развитию научных информационно-библиотечных систем для улучшения библиотечных ресурсов в соответствии с межрегиональными стандартами, приобретению научных приборов и информационной техники, вспомогательной инфраструктуры для проведения исследований; проведению и участию в научных мероприятиях, коллоквиумах, конгрессах и т. д.

Для развития международной кооперации открыты представительства DFG в Индии, Китае, США и России. Немецкое научно-исследовательское сообщество поддерживает международное сотрудничество в науке с помощью всех своих инструментов. Так как научные исследования не замыкаются в национальных границах, DFG, согласно своему уставу, обязуется поддерживать связи германской и зарубежной науки.

Отличительной особенностью участия в программах сообщества является отсутствие временных ограничений по срокам подачи заявок для участия в конкурсе. Они подаются в любое время в он-лайн режиме.

Деятельность Немецкого научно-исследовательского сообщества и БРФФИ направлена в первую очередь на поддержку фундаментальной науки, а также на расширение международной кооперации. В связи с этим сотрудничество двух организаций необходимо развивать, для чего требуются определенные механизмы взаимодействия. БРФФИ на протяжении длительного времени выступал инициатором активного диалога, в виду отсутствия четкого механизма сотрудничества этих двух организаций, определенного конкурса, аналогичного, например, конкурсу с Национальным центром научных исследований Франции «БРФФИ–НЦНИ».



Несмотря на это, опыт сотрудничества на уровне отдельных ученых и проектов уже есть. Ныне практика реализации совместных белорусско-немецких проектов выглядит следующим образом: белорусские ученые финансируются через конкурс БРФФИ «Наука-МС», а немецкий партнер — из других источников, не обязательно из DFG. На сегодня через Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований уже выполнено либо находятся в процессе реализации более 50 совместных проектов с представителями научных кругов Германии из различных вузов и научно-исследовательских институтов.



В рамках визита в Академию наук помимо презентации деятельности DFG состоялась встреча Председателя Президиума Национальной академии наук Беларуси Михаила Мясниковича с Йорном Ахтербергом и Кристианом Шайхом, переговоры с директором БРФФИ Валентином Орловичем и посещение Центральной научной библиотеки им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Одним из важнейших итогов прошедшего визита и переговоров с Председателем Научного совета — директором исполнительной дирекции БРФФИ Валентином Орловичем как раз и стала проработка возможных механизмов проведения совместных конкурсов DFG–БРФФИ, которые должны будут способствовать активизации и структурированию белорусско-немецкого научного сотрудничества. Немецкие представители выразили серьезную заинтересованность в расширении сотрудничества, особенно в областях, соответствующих приоритетам научной деятельности в обеих странах. Все предложения, представленные на переговорах белорусской стороной, будут доведены до сведения коллег из Германии.

Мария Житкова

ИТОГИ КОНКУРСОВ

КОНКУРС СОВМЕСТНЫХ ПРОЕКТОВ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЛОРУССКОГО РЕСПУБЛИКАНСКОГО ФОНДА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ВЬЕТНАМСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК И ТЕХНОЛОГИЙ «БРФФИ–ВАНТ-2010»

В декабре 2008 г. был объявлен конкурс совместных проектов фундаментальных и поисковых исследований «БРФФИ–ВАНТ-2010» с целью поддержки совместных фундаментальных научных исследований в областях, представляющих интерес для Республики Беларусь и Социалистической Республики Вьетнам. По результатам совместной экспертизы принято решение о финансировании 10 проектов. Ниже публикуется перечень финансируемых совместных научных проектов «БРФФИ–ВАНТ-2010», сгруппированных по 3 секциям. По каждому проекту приводится следующая информация: фамилия и инициалы руководителя с белорусской стороны, шифр и название проекта, название организации-исполнителя с белорусской стороны, название организации-исполнителя с вьетнамской стороны. Продолжительность выполнения проектов — 2 года.

Секция биологических, медицинских и аграрных наук

1. БАШИЛОВ А. В. *Проект* Б10В-002
Химический состав комплекса физиологически активных веществ *Potentilla alba* L., оценка его фармакологической активности и биотехнология получения активных компонентов лапчатки белой на основе клеточной культуры.
Исполнитель: Центральный ботанический сад НАН Беларуси (Минск), Институт химии ВАНТ.
2. КУХАРЕВА Л. В. *Проект* Б10В-009
Фитоценотическая оценка лекарственных растений, используемых местной этнической группой Дао Северной провинции Вьетнама.
Исполнитель: Центральный ботанический сад НАН Беларуси (Минск), Институт экологии и биологических ресурсов ВАНТ.
3. СПИРИДОВИЧ Е. В. *Проект* Б10В-003
Фиторесурсная оценка местных и интродуцированных видов хвойных растений как источника моно- и сесквитерпеновых соединений, создание стабилизированных форм эфирных масел и их эффективных композиций.
Исполнитель: Центральный ботанический сад НАН Беларуси (Минск), Институт химии ВАНТ.

Секция физики, математики и информатики

4. ГРАБЧИКОВ А. С. *Проект* Ф10В-006
Диодно накачиваемые твердотельные лазерные системы с нелинейным преобразованием частоты.
Исполнитель: Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (Минск), Институт физики ВАНТ.
5. СЕМКОВА Г. И. *Проект* Ф10В-007
Разработка принципов создания высокоразрешающих визуализаторов лазерного ИК-излучения.
Исполнитель: Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (Минск), Институт физики ВАНТ (Вьетнам).
6. ТИХОМИРОВ С. А. *Проект* Ф10В-005
Разработка нового типа фемтосекундных лазеров и их применение для исследования наноструктурированных материалов.
Исполнитель: Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (Минск), Институт физики ВАНТ (Вьетнам).
7. ХОДАСЕВИЧ М. А. *Проект* Ф10В-004
Оптические усилители видимого диапазона спектра на основе апконверсии в допированных ионами эрбия стеклах.
Исполнитель: Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (Минск), Институт материаловедения ВАНТ.

Секция химии и наук о Земле

8. КУРЧЕНКО В. П. *Проект* Х10В-001
Исследование закономерностей гидролиза белков молочной сыворотки растительными протеазами с целью получения гипоаллергенных пищевых продуктов.
Исполнитель: Белорусский государственный университет (Минск), Институт химии ВАНТ.
9. ЛАХВИЧ Ф. А. *Проект* Х10В-008
Синтез и биологическая активность производных тритерпенов ряда лупана.
Исполнитель: Институт биоорганической химии НАН Беларуси (Минск), Институт химии ВАНТ.
10. ШУТОВА Т. Г. *Проект* Х10В-010
Изучение гидролиза каррагинана с получением биологически активных олигосахаридов для использования в медицине и пищевой промышленности.
Исполнитель: Институт химии новых материалов НАН Беларуси (Минск), Институт химии природных соединений ВАНТ.

ВЕСТНИК ФОНДА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, № 1, 2010

на русском и белорусском языках

Редактор Т. П. Петрович

Компьютерная верстка О. Л. Смольская

Подписано в печать 16.03.2010. Выход в свет 25.03.2010. Формат 70 × 100¹/₁₆. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 7,64. Уч.-изд. л. 6,3. Тираж 162 экз. Заказ 143.

Цена номера: индивидуальная подписка — 16760 руб.; ведомственная подписка — 16829 руб.

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
ЛИ № 02330/0494405 от 27.03.2009. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, Минск.

Отпечатано в РУП «Издательский дом «Беларуская навука».