

Правительство Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Индекс УДК: 581.192, 582.975, 574.24, 58.04

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по проекту в рамках Программы поддержки совместных научных проектов между СПбГУ
и Университетом Тегерана JFS UT 2024 Pure ID: 121826640
«АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЗМА И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У ВИДОВ ВАЛЕРИАНЫ В УСЛОВИЯХ
ДЕФИЦИТА КИСЛОРОДА ВСЛЕДСТВИЕ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ И
ЗАБОЛАЧИВАНИЯ / METABOLIC AND GENE EXPRESSION ANALYSIS IN *VALERIANA*
SPECIES UNDER OXYGEN DEFICIENCY BY HYPOBARIC HYPOXIA AND WATERLOGGING»
(итоговый)

Руководитель НИР,
профессор,
доктор биологических наук

М.Ф. Шишова

24.12.2024

подпись, дата

Санкт-Петербург 2024

РЕФЕРАТ

Отчет 18 с., 1 кн., 7 рис., 2 табл., 23 источн.

МЕТАБОЛОМИКА, ГИПОКСИЯ, ЗАТОПЛЕНИЕ, ГИПОБАРИЧЕСКАЯ ГИПОКСИЯ, УСТОЙЧИВОСТЬ, *VALERIANA*, ГИДРОФИТЫ, МЕЗОФИТЫ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ

Представители семейства Валериановых хорошо известны своими лекарственными свойствами. Первоначально они были продемонстрированы для *Valeriana officinalis*. Однако на сегодняшний день семейство Валериановых насчитывает 10 родов и около 300 видов, различающихся спектрами накапливаемых метаболитов, имеющих, в том числе, и фармацевтическое значение. Эти соединения относятся к соединениям вторичного метаболизма растений. Способность накапливать соединения вторичного метаболизма невозможно без соответствующих изменений первичного обмена веществ. К сожалению работ по комплексному метаболомному профилированию представителей семейства Валериановых мало. Кроме того, очень обрывочны данные о стресс-индуцированном ускорении синтеза и накоплении биоактивных соединений в корнях валерианы.

Данный Проект ставил своей целью выяснить особенности центрального и вторичного метаболизма видов Валерианы, произрастающих в условиях заболачивания и гипобарической гипоксии.

Метаболитные профили листьев двух видов валерианы: *V. dioica* и *V. officinalis*, собранных в Ленинградской области, и обитающих в условиях подтопления и в сухом местообитании. Полученные профили включали около 120 соединений, из которых по базам данных было идентифицировано 40 индивидуальных соединений, еще для примерно 20 соединений был определен класс. В условиях недостатка кислорода (переувлажнение) продемонстрированы черты анаэробного метаболизма, характерные для устойчивых к дефициту кислорода растений, которые заключаются в накоплении карбоновых кислот гликолиза (глицерат, пируват), брожений (лактат) и цикла Кребса (фумарат и сукцинат), а также аминокислот, в том числе образованных из интермедиатов гликолиза (Сер) и метаболитов ГАМК-шунта (Глу, ГАМК). ГХ-МС метаболомное профилирование листьев и корней валерианы гулявниколистной (*V. sisymbriifolia*), полученных от Иранских коллег, выявило около 140 соединений, из которых по базам данных было идентифицировано 40 индивидуальных соединений, еще для примерно 10 соединений был определен класс. Особенность этих проб заключалась в том, что они были собраны на разном уровне высотности, т.е. в условиях гипербарической гипоксии. К сожалению, первичный анализ не выявило столь четкой зависимости изменения метаболических профилей от интенсивности гипобарически обусловленного недостатка кислорода, хотя в профилях самых высотных образцов были выявлены некоторые анаэробные метаболиты (сукцинат).

Иранские партнёры были сконцентрированы также на анализе валереновой кислоты – сесквитерпенового компонента эфирного масла, получаемого из подземной части растений валерианы. Полученные результаты показали наличие сложной кросс-регуляции её накопления между несколькими факторами. Например, помимо недостатка кислорода значительный вклад мог быть обусловлен низкими температурными показателями. Одним из дополнительных параметров, который целесообразно учитывать – изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза валереновой кислоты, а также транскрипционных факторов, которые могут принимать участие в регуляции этих процессов.

Таким образом, все поставленные в Проекте задачи выполнены. По результатам 2024 года подготовлена статья, которая будет опубликована в 2025 г. В ходе выполнения данного пилотного Проекта выявлены направления дальнейшего сотрудничества между коллективами СПбГУ и Университета Тегерана.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА о НИР	6
2.1. Состав исполнителей Проекта	6
2.2. Объекты и методы исследований	7
2.2.1. Объекты исследований	7
2.2.2. Пробоподготовка для метаболомного анализа	7
2.2.3. Газовая хроматография – масс-спектрометрия (ГХ-МС)	8
2.2.4. Интерпретация результатов ГХ-МС	8
2.2.5. Статистический анализ данных ГХ-МС	8
2.2.6. Экстракция валереновой кислоты и ВЭЖХ	9
2.3. Результаты и обсуждение	10
2.3.1. Метаболическое профилирование листьев видов валерианы, произрастающей в Ленинградской области	10
2.3.2. Метаболическое профилирование листьев и корней валерианы гулявниколистной .	12
2.3.3. Анализ содержания валереновой кислоты в корнях валерианы гулявниколистной методом ВЭЖХ	14
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	16
5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	17

1. ВВЕДЕНИЕ

Семейство валериановых (Valerianaceae) хорошо известно своими представителями в качестве лекарственных растений. Его полезное применение насчитывает более 2000 лет. Корневища и корни валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.) используется в терапии целого ряда заболеваний. Первоначально её использовали как седативное и снотворное средство (Bogacz et al., 2014). В настоящее время её значение возросло из-за ее антимикробной активности против *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* и других микроорганизмов (Eftekhari, 2020). Более того, её используют даже при терапии злокачественных новообразований (Liu et al., 2023). К сожалению, в большинстве случаев молекулярные механизмы такого воздействия на организм человека ещё предстоит выяснить (Bogacz et al., 2014). Недавно было проведено несколько пионерских работ с применением интегративного омиксного подхода, включая транскриптомные, протеомные и метаболомные исследования (Bolhassani et al., 2021). Например, было выявлено несколько ключевых генов, участвующих в реализации сети вторичных метаболитов *V. officinalis*. Фитохимические исследования выявили, что сесквитерпеноиды и иридоиды являются характерными компонентами в роде *Valeriana* (Wang et al., 2013). Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) идентифицировала ряд метаболитов эфирного масла, включая валереновые кислоты и другие их сесквитерпеновые производные (валеранон, валераналь), а также флавоноиды и алкалоиды (Navarrete, 2016; Srednicka-Tober et al., 2022).

Первоначальные лекарственные свойства были продемонстрированы для *V. officinalis*, но семейство Valerianaceae содержит 10 родов и около 300 видов (Murti et al., 2011). Хроматографические исследования обнаружили специфичность фитохимического состава среди видов. Наряду с этим некоторые свидетельства указали на зависимость профилей метаболитов от условий вегетации. Таким образом, оба параметра влияют на распространение видов валерианы, выращиваемых в качестве источника лекарственного сырья. Интенсификация биотехнологических подходов также поднимает вопрос о важности условий для стимуляции накопления специфических метаболитов. Важность такого биотехнологического применения, как волосовидные корни для видов валерианы, возрастает с изменением климата и нехваткой пахотных территорий, доступных для производства лекарственного сырья. Метаболические профили корней растений, выращенных в полевых условиях, существенно отличались от таковых у волосовидных корней валерианы (Filizadeh and Goodarzi, 2010).

Многочисленные исследования, полученные в экспериментах с культивированием лекарственных растений *in vivo* и *in vitro*, указывают на интегративное воздействие биотических и абиотических стрессовых факторов на аккумуляцию вторичных метаболитов (Isah, 2019). Тем не менее, мало что известно о стресс-индуцированном ускорении синтеза и накоплении биоактивных соединений в корнях валерианы. Недавно были опубликованы очень интересные результаты по метаболической адаптации Валерианы гималайской (*V. jatamansi* Jones ex Roxb.) к водному стрессу (Thakur et al., 2024). Дефицит воды снижал содержание гидроксивалереновой кислоты в надземных частях и увеличил его в подземных частях растений *V. jatamansi*. Напротив, стресс от затопления снижал содержание этого метаболита в корнях. В то время как ацевальтрат увеличивался в обеих тестируемых частях растения и при обоих типах стрессора в отличие от снижения вальтрата. Таким образом, была выявлена разница в метаболическом ответе на водный стресс, особенно между надземными и подземными частями. Принимая во внимание, что затопление сопровождалось дефицитом кислорода, возникает несколько важных вопросов. Зависит ли выявленный дисбаланс в накоплении биологически активных соединений в корнях валерианы от водного стресса или от гипоксии? Может ли быть какое-либо сходство, если недостаток кислорода из-за переувлажнения сменяется его дефицитом, возникающим в результате гипобарической гипоксии (в горах)?

Несомненно, вторичный метаболизм является прямым продолжением путей центрального метаболизма. В целом ряде исследований были выявлены изменения в накоплении углеводов, пирувата и лактата, метаболитов цикла Кребса, пула аминокислот и жирных кислот при кислородной недостаточности (Yemelyanov et al., 2023). Особый интерес представляет то, как подтопление и/или гипобарическая гипоксия влияет на баланс основных групп метаболитов в растениях валерианы? Поэтому необходимы исследования метаболических изменений у видов валерианы при дефиците кислорода из-за гипобарической гипоксии и затопления.

Цель проекта: Выяснить особенности центрального и вторичного метаболизма видов Валерианы, произрастающих в условиях заболачивания и гипобарической гипоксии.

Задачи:

1. Сравнить метаболические профили *V. officinalis* и *V. dioica*, произрастающих в Ленинградской области в естественной среде обитания при разных условиях доступности кислорода;
2. Оценить различия в метаболических процессах *V. sisymbriifolia*, произрастающих в естественных местообитаниях в северных районах Ирана в условиях нормоксии и гипобарической гипоксии;
3. Дать перекрестные оценки между видами Валерианы в условиях двух стрессовых факторов, приводящих к кислородному голоданию;
4. Оценить изменения в экспрессии генов, ответственных за продукцию вторичных метаболитов у видов Валерианы в условиях гипобарической гипоксии и затопления.

2. ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ ОТЧЕТА о НИР

2.1. Состав исполнителей Проекта

Руководитель проекта со стороны СПбГУ: проф. Шишова М.Ф.

Коллектив СПбГУ: доцент Емельянов В.В., ассистент Смирнов П.Д.

Руководитель проекта со стороны Университета Тегерана: Prof. Mohammad Reza Naghavi

Коллектив Университета Тегерана: исследователь PhD Sadegh Asadi; исследователь PhD Mohtaram Mahmoudieh

В ходе выполнения Проекта постоянно происходило обсуждение и корректировка планов по сбору проб. Особое внимание было уделено выбору территорий Ленинградской области с признаками увлажнения и максимального видоразнообразия валерианы, а также точек сбора в горах.

В результате пробы растений были собраны Российской стороной в Гатчинском парке, а Иранскими партнёрами в горах провинции Исфахан, Иран (см. табл. 1). Далее пробы фиксировали, как отмечено в разделе Материалы и методы.

По плану реализации Проекта ожидался визит проф. Мохаммеда Реза Нагави в Санкт-Петербург. Визит был полностью подготовлен, включая официальные бумаги для оформления визы. Однако планы руководителя Проекта со стороны Университета Тегерана несколько изменились, и он участвовал с докладом, а также как руководитель секции, на IV международной конференции «Безопасность и качество продуктов питания» (30 сентября – 02 октября 2024 г.) и визит в СПбГУ был отменен по решению проф. М.Р. Нагави. В результате доц. В.В. Емельянов был экстренно командирован с Москву для обмена пробами и обсуждения первичных результатов. В дальнейшем обмен результатами происходил регулярно по электронной почте. В настоящее время обсуждается план публикации полученных и обработанных статистически результатов.

2.2. Объекты и методы исследований

2.2.1. Объекты исследований

Исполнителями проекта со стороны СПбГУ в июне 2024 г. проведён сбор образцов двух видов валерианы, произрастающих в Ленинградской области. Растения собирали в Гатчинском парке «Зверинец» (г. Гатчина, Гатчинский район, Ленинградская область). Выбор места сбора был обусловлен единственным в Ленинградской области местом произрастания валерианы двудомной (*V. dioica* L.) во влажном тенистом подлеске (см. табл. 1). Образцы валерианы лекарственной (*V. officinalis* L.) собирали в условиях подтопления, у растений, произраставших в непосредственной близости от ручья, с подтопленной ризосферой, то есть тех растений, которые испытывали ограничение доступа кислорода к органам и тканям, и у растений, произраставших на сухой лесной поляне. У валериан собирали листья в 4 биологических повторностях, срезая листья примерно одного размера и одной генерации от разных растений. Следили, чтобы они не были поражены патогенами и фитофагами. Видовую принадлежность растений определяли с помощью «Иллюстрированного определителя растений Ленинградской области» (Аверьянов и др., 2006).

Таблица 1. Характеристики мест сбора образцов.

№	вид	место сбора	высота, м*	координаты
1.	<i>Valeriana sisymbriifolia</i> Vahl.	гора Корде-Оля-Тиран	2436	32°54'54" с. ш. 50°42'25" в. д.
2.		гора Гулистанкух	2680	33°08'39" с. ш. 50°23'49" в. д.
3.		гора Мадан	2880	32°91'47" с. ш. 50°09'48" в. д.
4.		гора Ферейдуншахр	2668	32°92'89" с. ш. 50°09'22" в. д.
5.		гора Корде-Оля-Абшар	2406	32°91'68" с. ш. 50°69'36" в. д.
6.	<i>Valeriana dioica</i> L.	г. Гатчина, парк Зверинец, Чудо-Поляна	99	59°57'62" с. ш. 30°10'82" в. д.
7.	<i>Valeriana officinalis</i> L.	г. Гатчина, парк Зверинец, у ручья	98	59°57'49" с. ш. 30°11'14" в. д.
8.		г. Гатчина, парк Зверинец, сухая поляна	100	59°57'48" с. ш. 30°10'92" в. д.

* метров над уровнем моря

Иранские партнёры собирали листья и корни растений валерианы гулявниколистной (*V. sisymbriifolia* Vahl.) в июне 2024 г. на разных высотах в Загросских горах в провинции Исфахан, Иран между городами Даран и Тиран (см. табл. 1).

Всего собрано 22 растительных образца.

2.2.2. Пробоподготовка для метаболомного анализа

Для анализа метаболома листья валерианы (200 мг) взвешивали на портативных электронных весах прямо на месте сбора, нарезали на мелкие кусочки и фиксировали в 1 мл метанола. В течение 2 ч образцы доставляли в лабораторию, где метанольный экстракт переносили в новую микропробирку, а растительные остатки измельчали в шаровой мельнице Tissue Lyser LT (Qiagen, Германия) с металлическими шариками диаметром 5 мм и частотой 50 ударов в секунду в течение 2 минут (Пузанский и др., 2022; Смирнов и др., 2023). Для экстракции пробы заливали 1 мл метанола и встряхивали на термошейкере TS-100C (BioSan, Латвия) в течение 45 минут при +4°C и 900 оборотах в

минуту. Затем проводили центрифугирование на центрифуге MPW-350R (Польша) в течение 10 минут при температуре +4°C и 12000 g. Жидкую фазу переносили в новые микропробирки, а нерастворимый остаток заливали 0,75 мл метанола, снова встряхивали на термошейкере и после центрифугирования жидкие фазы объединяли. Процедуру промывки повторяли. Суммарный экстракт метаболитов упаривали досуха на вакуумном испарителе Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Германия) при 15°C. До дальнейших манипуляций пробы хранили в морозильнике при -80°C.

Для сухих образцов *V. sisymbriifolia*, полученных в Москве от Иранской стороны, взвешивали 40 мг листьев и 55 мг корней, что соответствовало 200 мг сырой массы этих органов. Далее метаболиты экстрагировали как для сырых образцов.

Сухой материал после хранения упаренных образцов растворяли в пиридине, содержащем внутренний стандарт – трикозан (nC_{23}), добавляли силилирующий агент BSFA : TMCS (99 : 1, v/v, Sigma) и дериватизировали полученные растворы, инкубируя их в течение 30 мин при 90°C на термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия).

2.2.3. Газовая хроматография – масс-спектрометрия (ГХ-МС)

Для анализа метаболома использовали газовый хроматограф Agilent 5860 (Agilent Technologies, США) под контролем программного обеспечения Agilent ChemStation E.02.02.1431. Для автоматического ввода проб использовался автосамплер Agilent 7893. Разделение проводили на капиллярной колонке J&W HP-5MS. Газ-носитель – гелий, постоянный поток 1 мл/мин, температура источника ионов – 230°C, квадрупольного фильтра масс 150°C. Температурный режим термостата колонки: начальная температура 70°C, затем линейное повышение до 320°C со скоростью 4°C/мин (Пузанский и др., 2018). Регистрацию хроматограммы проводили с помощью масс-селективного детектора Agilent 5975С. Диапазон масс: 50–700 m/z. Исследования выполнены с использованием хроматографического оборудования Ресурсного центра СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”.

2.2.4. Интерпретация результатов ГХ-МС

Полученные хроматограммы обрабатывали с помощью программы MS-DIAL 4.9 (Lai et al., 2018). Были использованы библиотеки GMD (The Golm Metabolome Database, Германия), а также библиотека лаборатории аналитической фитохимии Ботанического института РАН. Дополнительно для идентификации масс-спектров были применены программы AMDIS и NIST MSEARCH NIST (National Institute of Standards and Technology, США), в сочетании с библиотеками NIST08. Идентификацию метаболитов осуществляли по сходствам масс-спектров с библиотечными и по индексам удерживания (RI). Определение RI проводили по калибровке, используя предельные углеводороды. Содержание метаболитов нормировали на внутренний стандарт трикозан (нормальный углеводород C23).

2.2.5. Статистический анализ данных ГХ-МС

Анализ метаболомных данных проводили с использованием R4.2.1 «Funny-Looking Kid» (R Core Team, 2023). Данные были нормализованы относительно выборочной медианы. Выбросы обнаруживали и исключали на основе теста Диксона в пакете outliers (Komsta, 2022). Данные логарифмировали и стандартизировали. Если соединение не было обнаружено в конкретном образце, но присутствовало в остальных повторностях, это считалось технической ошибкой, и проводилась импутация с помощью метода KNN (k-ближайших соседей) с помощью пакета impute (Hastie et al., 2022). Метод главных компонент (principal component analysis - PCA) выполняли с помощью pcaMethods (Stacklies et al., 2007). OPLS-DA (дискриминантный анализ методом ортогональных проекций на латентные структуры) проводили с помощью пакета ropls. Факторные нагрузки предиктивной компоненты и VIP (важность переменной в проекции) использовали для

оценки статистической взаимосвязи между переменными и интересующим фактором (Thevenot et al., 2015). Модели оценивали по R^2Y предиктивной компоненты и вероятности Q^2Y ($p < 0,01$). Для избежания смещения вследствие несбалансированности групп применяли взвешенное центрирование (Brereton, Lloyd, 2013).

2.2.6. Экстракция валереновой кислоты и ВЭЖХ

Экстракция валереновой кислоты и анализ ВЭЖХ проводились Иранской стороной в соответствии с протоколом Mokhtari et al., (2024). Высушенные корни и надземные части растений по отдельности измельчали в мелкий порошок с помощью блендера Kahler chopper KH-157-B (Германия). Растительные материалы, собранные из каждого места, объединяли перед измельчением. К 100 мг тонко измельченных сухих корней и надземных частей добавляли в общей сложности 1 мл 70% метанола. Затем образцы подвергали ультразвуковой обработке с использованием системы BANDELIN SONEREX RK-100H (Германия) в течение 10 минут при мощности 320 Вт и частоте 35 кГц. После обработки ультразвуком образцы тщательно перемешивали в течение 30 минут при 350 об/мин. Полученные смеси центрифугировали при 8000 g в течение 10 минут, а супернатант переносили в пробирки объемом 2 мл. Этот процесс центрифугирования и сбора повторяли дважды. После корректировки конечных объемов до 1,5 мл образцы готовили для анализа с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Содержание валереновой кислоты в образцах оценивали с помощью ВЭЖХ (SYKAM S 9100 GmbH, Германия) с автоматическим пробоотбирателем SYKAM S 5300, кватернарным градиентным насосом ВЭЖХ S 2100, УФ/видимым детектором S 3210 с программным обеспечением Clarity (версия 7.3.0.95, 2017). Образец объемом 100 мкл вводили в колонку Eurospher II 100-5, поддерживаемую при 60°C. В качестве подвижной фазы использовалась градиентная система, включающая (А) 0,1% трифторуксусной кислоты в воде и (В) ацетонитрил. Градиент начинался с 5% В в течение 5 минут, затем увеличивался до 95% В в течение 20 минут, поддерживался на уровне 95% В в течение дополнительных 15 минут и, наконец, возвращался к 5% В в течение 1 минуты. Скорость потока была установлена на уровне 0,4 мл/мин. Калибровочная кривая была создана с использованием стандарта валереновой кислоты для облегчения количественной оценки образцов. Измерение общего содержания валереновой кислоты выражалось в миллиграммах на грамм веса сухого корня/надземных частей, и каждый анализ проводился в трех повторностях. Данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием R версии 4.4.1 (2024-06-14).

2.3. Результаты и обсуждение

2.3.1. Метаболическое профилирование листьев видов валерианы, произрастающей в Ленинградской области

С помощью ГХ-МС командой из СПбГУ были проанализированы метаболитные профили листьев двух видов валерианы: *V. dioica* и *V. officinalis*, последнюю в условиях подтопления и в сухом местообитании. Полученные профили включали около 120 соединений, из которых по базам данных было идентифицировано 40 индивидуальных соединений, еще для примерно 20 соединений был определен класс. В полученных профилях наиболее широко были представлены сахара (28), включая пентозы (4), гексозы (11) и олигосахариды (13), а также их производные, такие как сахароспирты и сахарокислоты. Было идентифицировано 3 аминокислоты, около 15 карбоновых кислот, включая интермедиаты цикла Кребса (4), метаболиты гликолиза и брожений (3), а также небольшое число свободных жирных кислот, ацилглицеринов, стероидов, аминов и фенольных соединений (3). Идентифицированы характерные для валериан валериановая и изовалериановая кислоты и их производные.

Для выявления сходств и различий метаболомов был применен метод главных компонент (PCA). Результаты сравнения представлены в пространствах счетов первых двух главных компонент (рис. 1). По главной компоненте 1 (ГК1), объясняющей 34,7% дисперсии, профили метаболитов *V. dioica* резко отличались от таковых *V. officinalis*. По второй главной компоненте (ГК2) наблюдались отличия между метаболомами *V. officinalis*, произраставшими в условиях затопления и с норме (16,2% дисперсии). Более того, листья *V. dioica*, которая произрастала в промежуточных по влажности условиях, занимали промежуточное положение по этой главной компоненте.

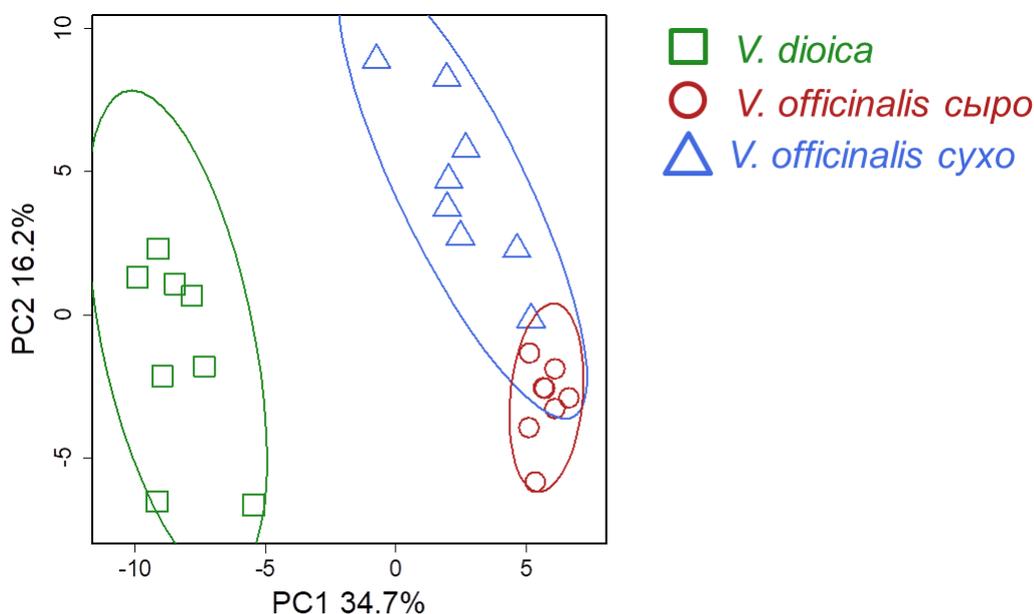


Рисунок 1. График матрицы счетов, полученный методом главных компонент (PCA) при анализе метаболомных профилей листьев валерианы разных видов. Точки соответствуют профилям метаболитов листьев валериан; эллипсы — 95 % доверительные интервалы.

Сопоставление метаболомов двух видов валериан *V. dioica* и *V. officinalis* представлено на рис. 2. Построенная OPLS-DA модель включала одну ортогональную компоненту. С предиктивной компонентой, отражающей различия групп, было связано 35% дисперсии, $Q^2Y = 0,8$. Можно отметить, что для *V. dioica* было характерно большее

содержание сахарозы, мальтозы и других сложных сахаров, жирных кислот, фумарата и сукцината. *V. officinalis* аккумулировала больше серина и моносахаридов.

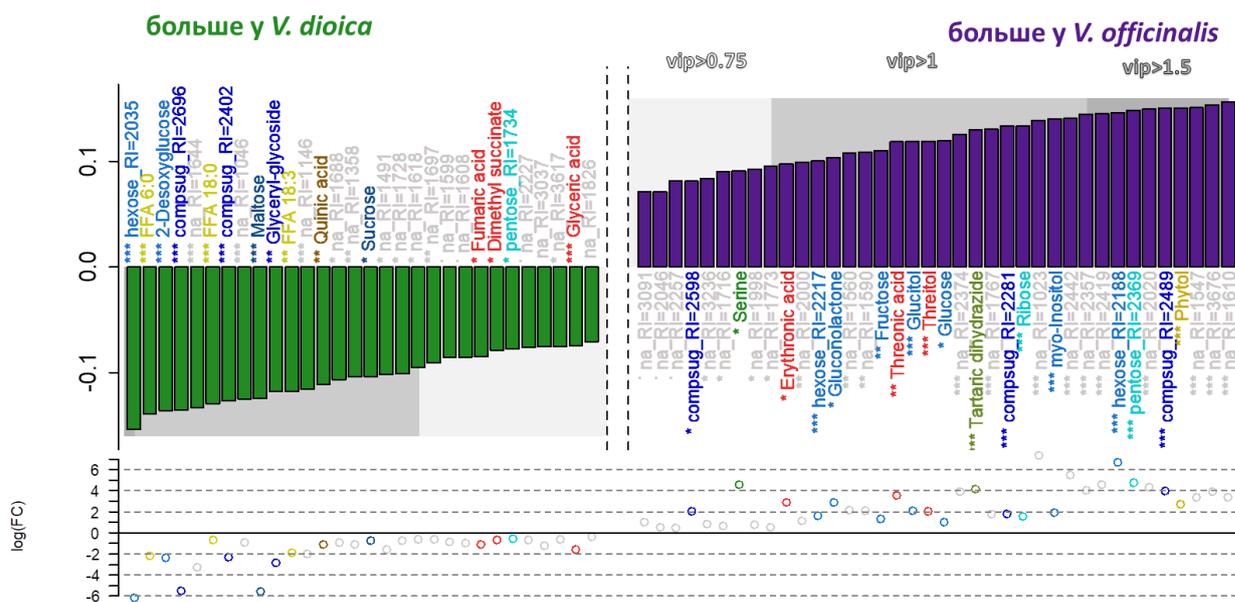


Рисунок 2. Диаграмма факторных нагрузок предиктивной компоненты (VIP>1) из моделей OPLS-DA с которой связаны различия метаболических профилей листьев *V. dioica* и *V. officinalis*.

Анализ с обучением метаболомов листьев *V. officinalis*, произрастающих в различных условиях увлажнения выявил сходные отличия (рис. 3). С предиктивной компонентой, отражающей различия групп, было связано 27% дисперсии, $Q^2Y = 0,8$. Валериана, росшая рядом с ручьём, в условиях подтопления почвы и дефицита кислорода, содержала больше сахарозы, органических кислот, включая метаболиты гликолиза (глицерат, пируват), брожения (лактат) и цикла Кребса (сукцинат и фумарат), аминокислоты (ГАМК, Глу и Сер). В более сухих условиях, где не было переувлажнения и дефицита кислорода, листья содержали большое количество сахаров.

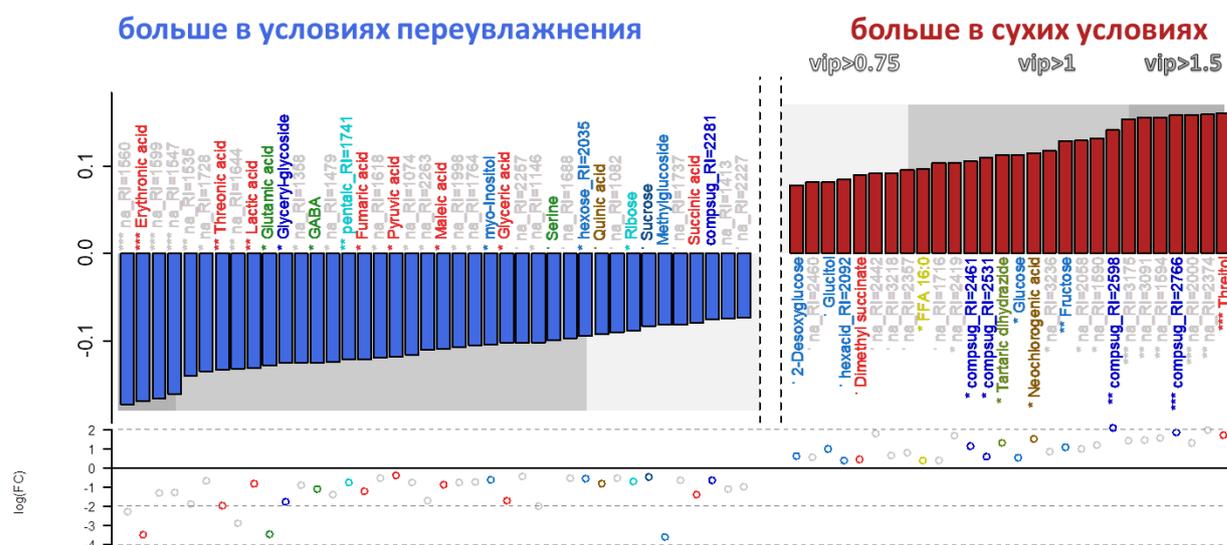


Рисунок 3. Диаграмма факторных нагрузок предиктивной компоненты (VIP>1) из моделей OPLS-DA с которой связаны различия метаболических профилей листьев *V. officinalis* в условиях нормальной аэрации и переувлажнения.

Таким образом, виды валерианы, произрастающие в Ленинградской области, чётко различались друг от друга метаболически. Более того, растения, обитающие в условиях переувлажнения и вызванного им дефицита кислорода, *V. dioica* и *V. officinalis*,

демонстрировали черты анаэробного метаболизма, характерные для устойчивых к дефициту кислорода растений, накапливая карбоновые кислоты гликолиза (глицерат, пируват), брожений (лактат) и цикла Кребса (фумарат и сукцинат), а также аминокислоты, в том числе образованные из интермедиатов гликолиза (Сер) и метаболиты ГАМК-шунта (Глу, ГАМК). Образование этих маркерных метаболитов (за исключением лактата) обеспечивается функционированием аноплетротических путей обмена веществ, осуществляющих альтернативную регенерацию окисленного НАД(Ф)⁺, необходимого для эффективного протекания гликолиза, избегая аккумуляции токсичных метаболитов брожений (ацетальдегид и этанол). Синтез аминокислот при недостатке кислорода также обеспечивает ассимиляцию азота, синтез азотистых соединений, осмотическую регуляцию и поддержание внутриклеточного рН. Полученные данные укладываются в общую концепцию метаболической адаптации к недостатку кислорода, рассмотренную нами ранее в обзоре (Yemelyanov et al., 2023).

2.3.2. Метаболическое профилирование листьев и корней валерианы гулявниколистной

Помимо анализа метаболомов местных видов валерианы, было проведено метаболомное профилирование листьев и корней валерианы гулявниколистной (*V. sisymbriifolia*), полученных от Иранских коллег. Образцы растений были собраны ими в горах провинции Исфахан в центральном Иране с разных высот (табл. 1). Образец 5 – с высоты 2400 м, образцы 2 и 4 – с высоты около 2700 м, образец 3 – с высоты около 2900 м. В горах с увеличением высоты уменьшается атмосферное давление. В среднем, на каждые 1000 м подъема давление падает на 100 мм ртутного столба. Если высота горы 3000 м, а давление у подножия 760 мм рт. ст., то на вершине горы давление будет 460 мм, и живые существа окажутся в условиях разреженного воздуха с пониженным уровнем кислорода – так называемой гипобарической гипоксии. Перепад высот между растениями образца 5 и образца 3 составил около 500 м.

Полученные метаболические профили включали около 140 соединений, из которых по базам данных было идентифицировано 40 индивидуальных соединений, еще для примерно 10 соединений был определен класс. В полученных профилях наиболее широко были представлены сахара (17), включая пентозы (2), гексозы (8) и олигосахариды (7). Было идентифицировано около 15 карбоновых кислот, а также небольшое число свободных жирных кислот и фенольных соединений (4). В целом, способ экстракции не из свежесобранного, а высушенного материала, оказался менее эффективным для идентификации соединений в метаболомном спектре.

В пространстве главных компонент метаболомные профили растений всех четырёх проанализированных локаций (2-5) чётко разделились, как в побегах, так и в корнях (рис. 4). Метаболиты листьев самого высокогорного образца 3 группировались с образцом 2 из средней высотной группы (рис. 4А), тогда как метаболиты корней были наиболее близки у самого низковисотного образца 5, образца 2 из средней высотной группы и высокогорного образца 3 (рис. 4Б). Таким образом, чётких взаимосвязей между высотностью и метаболическими профилями у валерианы гулявниколистной на данном этапе выявить не удалось. Построение OPLS-DA моделей выявило большее накопление производных валериановой и изовалериановой кислот в листьях наиболее высокогорного образца (рис. 5). В корнях высокогорной валерианы показана аккумуляция сложных сахаров, включая сахарозу и сукцинат, т.е. прослеживались аналогии с подтопленными российскими валерианами, однако окончательные выводы делать пока рано, и требуется продолжение исследований данного направления.

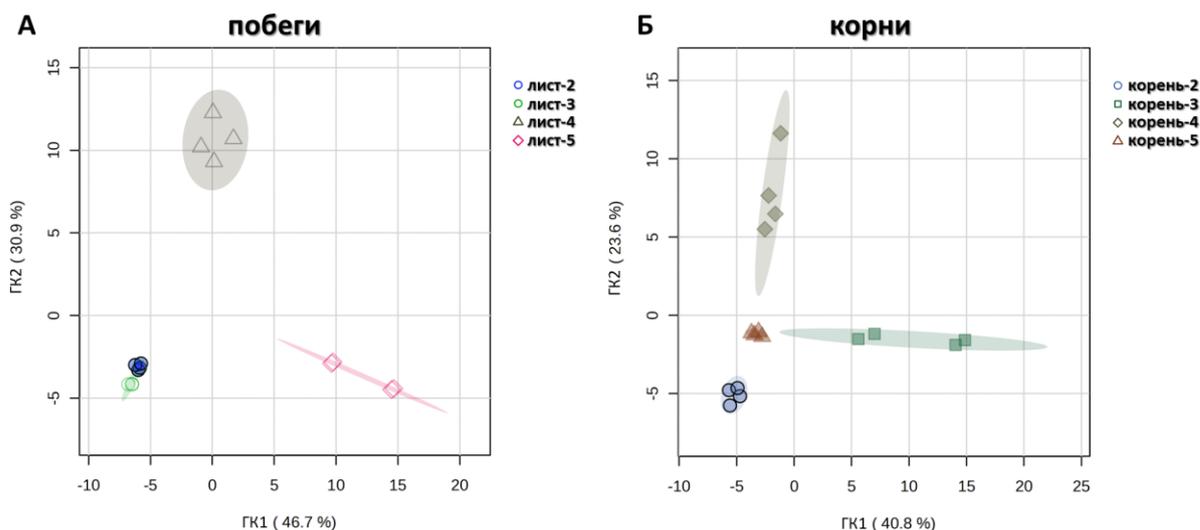


Рисунок 4. Графики матрицы счетов, полученные методом главных компонент (PCA) при анализе метаболомных профилей листьев (А) и корней (Б) валерианы гулявниколистной (*V. sisymbriifolia*). Точки соответствуют профилям метаболитов; эллипсы — 95 % доверительные интервалы.

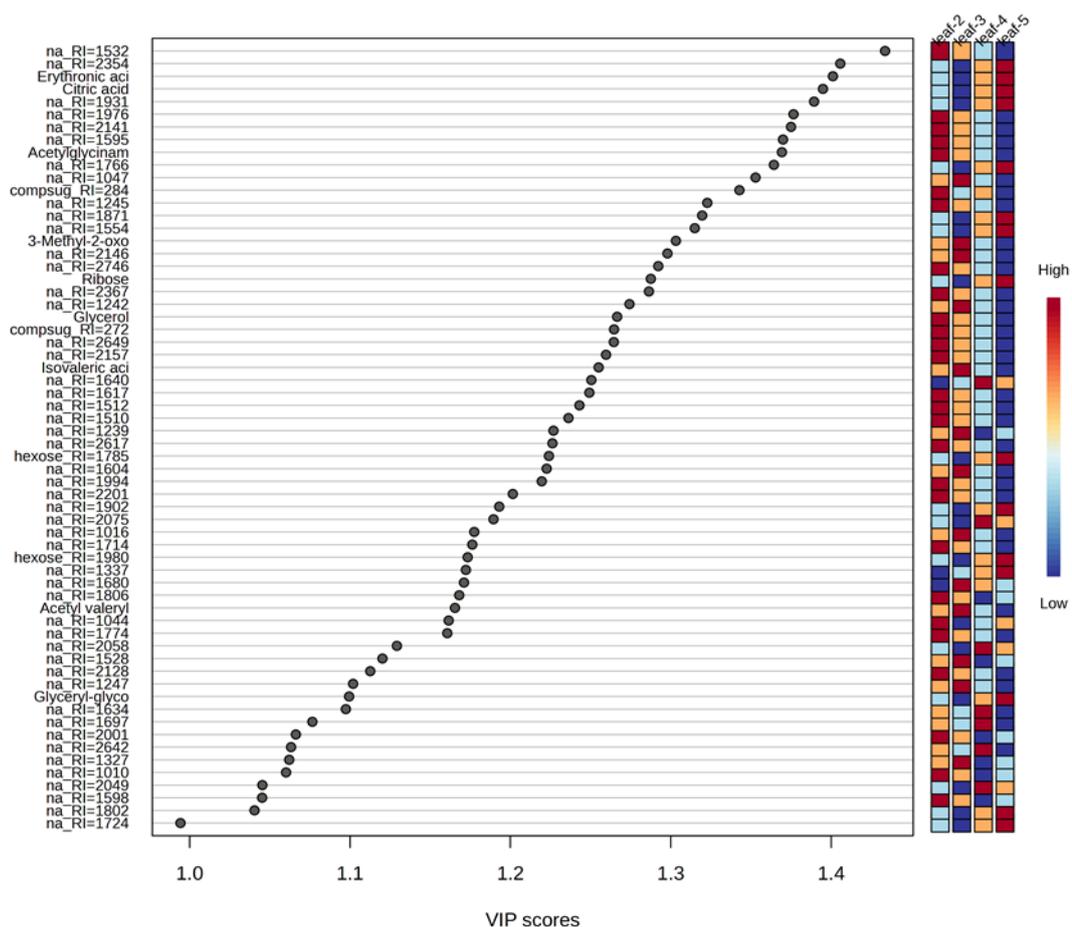


Рисунок 5. Диаграмма факторных нагрузок предиктивной компоненты (VIP>1) из моделей OPLS-DA с которой связаны различия метаболомных профилей листьев валерианы гулявниколистной (*V. sisymbriifolia*).

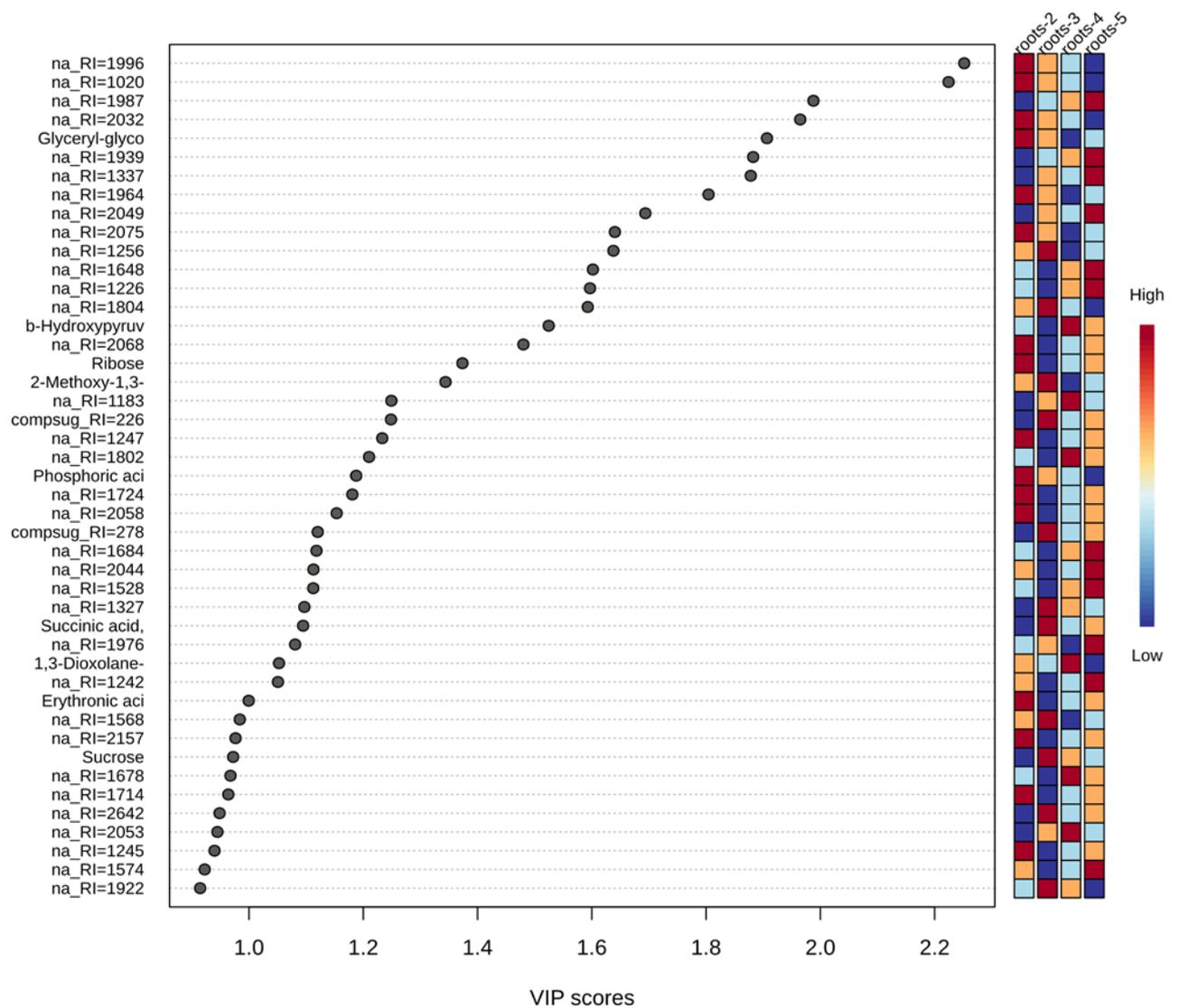


Рисунок 6. Диаграмма факторных нагрузок предиктивной компоненты (VIP>1) из моделей OPLS-DA с которой связаны различия метаболических профилей корней валерианы гулявниколистной (*V. sisymbriifolia*).

2.3.3. Анализ содержания валереновой кислоты в корнях валерианы гулявниколистной методом ВЭЖХ

Иранские партнёры были сконцентрированы на анализе валереновой кислоты – сесквитерпенового компонента эфирного масла, получаемого из подземной части растений валерианы. Это соединение известно своими нейропротекторными и седативными свойствами и часто используется для лечения бессонницы. Недавние исследования *in vitro* и *in vivo* дополнительно подтвердили роль валереновой кислоты как естественного анксиолитического средства. Кроме того, было показано, что она подавляет рост и инвазию глиобластомы, смягчает нейровоспаление, связанное с болезнью Паркинсона, и проявляет антиоксидантные свойства в экстрактах корней *V. officinalis*, *Nardostachys jatamansi* (D.Don) DC. (*V. jatamansi* D.Don) и *V. sisymbriifolia* (Das et al., 2021). Содержание производных валереновой кислоты в экстрактах из подземной и надземной частей *V. sisymbriifolia* анализировали с помощью ВЭЖХ. Содержание этого метаболита в побегах очень низкое. В целом, корневища с корнями *V. sisymbriifolia* накапливали большие количества валереновой кислоты, чем у *V. officinalis* (рис. 7).

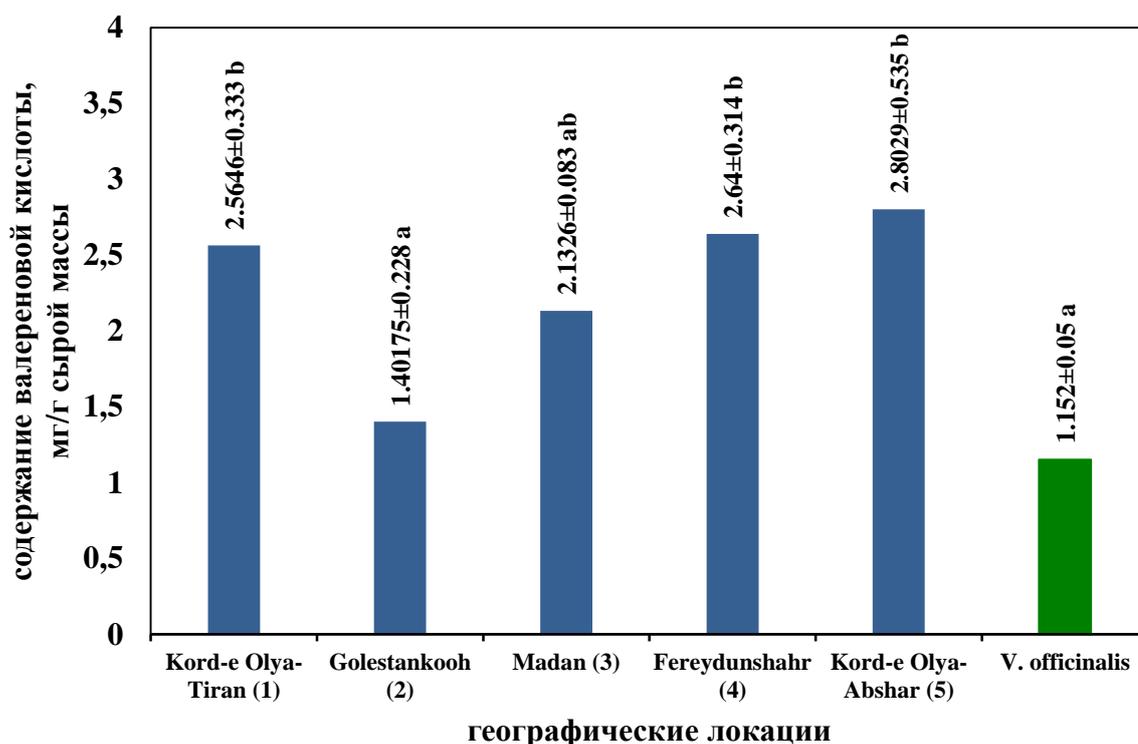


Рисунок 7. Содержание валереновой кислоты в корнях *V. officinalis* (зелёный столбик) и *V. sisymbriifolia* из различных географических мест. Средние значения с разными буквами в столбце статистически значимы на уровне вероятности 5%.

Растения *V. sisymbriifolia*, собранные на низких и средних высотах содержали большие количества валереновой кислоты, что может быть связано с несколькими факторами, включая более низкие температуры на больших высотах, которые могут влиять на содержание этих соединений. Эти результаты указывают на сложное взаимодействие между факторами окружающей среды и распределением валереновой кислоты и других метаболитов, подчеркивая необходимость дальнейшего изучения.

Для дальнейшего анализа биосинтеза валереновой кислоты были разработаны праймеры к генам, кодирующим ферменты синтеза валереновой кислоты, а также транскрипционных факторов, которые могут принимать участие в регуляции этих процессов (табл. 2).

Таблица 2. Праймеры к генам интереса, использованным в работе.

Последовательности праймеров	
VDS-F: GCATACTCAACCCGGTAGGA VDS-R: TTCACCGATGCAGTCAAAAG	FPP-F: TCATTTGCCAGATGCTGTCT FPP-R: TGCTGTAAACGACGGTGTGT
SS5-F: TACCCATTTAAAGGCGTCCTC SS5-R: ATGATAAAAGTAATGTGCCGAA	DXS-F: ACTATTTCCGGCTCGTAGTTCTG DXS-R: CCACCAACTCCTCTGTTAGATAC
DS-F: ACCGATTGACACTACCGCAT DS-R: AGCTATCGCCAAGTGCTACG	MYC2-F: CTGCCCTGGAAGACCATCTC MYC2-R: TTTCCGGTACTCAAGCCTCG
GGPS-F: TTCCACCTCCCAGAATAGCG GGPS-R: ATAGCTTCCACCGGAGTGTC	TF1-F: TCCTACCTCTATGCCAGCC TF1-R: GTAACAATCCCGGTCTACGC
HMGR-F: GТАCTATGCCTTCATACTCCC HMGR-R: CTGCCCTAGAATAGACTCGT	ERE-F: GTAGGCTTTAGCGGCTTCCT ERE-R: AGAGGTGCATTACAGAGGCG
DXR-F: GGATGATAGACTGAGGGTGGATAA DXR-R: CCAAACCTGGAGCATGGGTAAA	MYB-F: TCACTCCACATGAAGAAGGCA MYB-R: ATCGGTTTCGTTGAGGAAGGT
WRKY-F: CTGTTATCGGATGATTCCGGTCTT WRKY-R: TCGGAGACTAGTTCTAGTGATGAA	MYC1-F: TCACATCTATTTCCACATCAACAAG MYC1-R: GACAAGGACGAGCTGAATCATA

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленный Отчет основывается на исследованиях, которые были проведены с учетом научных интересов каждой из групп, но который позволил выполнить целый ряд задач, требующих объединения методических подходов и приборных баз, доступных в университетах Санкт-Петербурга и Тегерана. На модельном объекте – представителях семейства Валериановых, хорошо известных своими лекарственными свойствами, было проанализировано изменение первичного метаболизма и накопление валереновой кислоты.

С помощью ГХ-МС анализа было убедительно продемонстрировано, что виды валерианы, произрастающие в Ленинградской области, четко различались друг от друга метаболически. В условиях переувлажнения и вызванного им дефицита кислорода, *V. dioica* и *V. officinalis*, демонстрировали черты анаэробного метаболизма, характерные для устойчивых к дефициту кислорода растений

Однако сходный анализ проб, предоставленных иранскими коллегами, не выявило столь четкой зависимости изменения метаболических профилей от интенсивности гипербарически обусловленного недостатка кислорода. Тем не менее, одна из причин данного факта может быть обусловлена иным способом пробоподготовки в связи с особенностью логистики.

Последующий анализ содержания валереновой кислоты в корневищах и корнях *V. sisymbriifolia* показал наличие сложной кросс-регуляции её накопления между несколькими факторами. Например, помимо недостатка кислорода значительный вклад мог быть обусловлен низкими температурами высоко в горах. Одним из дополнительных параметров, который целесообразно учитывать – изменение экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза валереновой кислоты, а также транскрипционных факторов, которые могут принимать участие в регуляции этих процессов. В ходе реализации Проекта иранские коллеги разработали праймеры, которые в дальнейшем могут быть использованы при проведении реакции РТ-ПЦР.

Таким образом, все поставленные задачи Проекта выполнены, получены принципиально новые данные, которые будут в ближайшее время подготовлены к публикации. Очень важный аспект полученных результатов – они указывают, в каком направлении целесообразно вести дальнейшие исследования, что коллектив Проекта будет использовать при подготовке нового проекта.

5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов Л.В., Буданцев А.Л., Гельтман Д.В., Конечная Г.Ю., Крупкина Л.И., Сенников А.Н. Иллюстрированный определитель растений Ленинградской области / под ред. Яковлева Г.П., Буданцева А.Л. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 799 с.
2. Пузанский Р.К., Емельянов В.В., Шаварда А.Л., Гавриленко Т.А., Шишова М.Ф. Возрастные и органоспецифичные различия метаболома растений картофеля *Solanum phureja* // Физиология растений. – 2018. – Т. 65, № 6. – С. 451-462. DOI: 10.1134/S001533031806012X [Puzanskiy R.K., Yemelyanov V.V., Shavarda A.L., Gavrilenko T.A., Shishova M.F. Age- and organ-specific differences of potato (*Solanum phureja*) plants metabolome // Russ. J. Plant Physiol. – 2018. – Vol. 65, No. 6. – P. 813-823. DOI: 10.1134/S1021443718060122]
3. Пузанский Р.К., Смирнов П.Д., Ванисов С.А., Дубровский М.Д., Шаварда А.Л., Шишова М.Ф., Емельянов В.В. Метаболическое профилирование листьев трех видов кипрея // Экологическая генетика. – 2022. – Т. 20, № 4. – С. 279–293. [Puzanskiy R.K., Smirnov P.D., Vanisov S.A., Dubrovskiy M.D., Shavarda A.L., Shishova M.F., Yemelyanov V.V. Metabolite profiling of leaves of three *Epilobium* species // Ecol. Genet. – 2022. – Vol. 20, No. 4. – P. 279–293.] DOI: 10.17816/ecogen114743
4. Смирнов П.Д., Пузанский Р.К., Ванисов С.А., Дубровский М.Д., Шаварда А.Л., Шишова М.Ф., Емельянов В.В. Метаболическое профилирование листьев четырех видов лютика // Экологическая генетика. – 2023. – Т. 21, № 4. – С. 369–382. [Smirnov P.D., Puzanskiy R.K., Vanisov S.A., Dubrovskiy M.D., Shavarda A.L., Shishova M.F., Yemelyanov V.V. Metabolic profiling of leaves of four *Ranunculus* species // Ecol. Genet. – 2023. – Vol. 21, No. 4. – P. 369–382.] DOI: 10.17816/ecogen623592
5. bioconductor.org. Hastie T, Tibshirani R, Narasimhan B, Chu G. Impute: Imputation for microarray data. R package version 1.70.0. [Электронный ресурс]. – 2022. – URL: <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/impute.html> (дата обращения 14.03.2023).
6. Bogacz A., Mrozikiewicz P., Monika Karasiewicz, Bartkowiak-Wieczorek I.B., Majchrzycki ., Mikołajczak P.L., Ozarowski M., Grzeskowiak E. The influence of standardized *Valeriana officinalis* extract on the *CYP3A1* gene expression by nuclear receptors in in vivo model. // BioMed Res. Int. – 2014. – 819093. DOI: 10.1155/2014/819093
7. Bolhassani M., Niazi A., Tahmasebi A., Moghadam A. Identification of key genes associated with secondary metabolites biosynthesis by system network analysis in *Valeriana officinalis*. // J. Plant Res. – 2021. – Vol. 134, No. 3. – P. 625-639. DOI: 10.1007/s10265-021-01277-5
8. Breerton R.G., Lloyd G.R. Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away // J. Chemom. – 2013. – Vol. 28, No. 4. – P. 213-225. DOI: 10.1002/cem.2609
9. CRAN.R-project.org. Komsta L. outliers: Tests for Outliers. R package version 0.15 [Электронный ресурс]. – 2022. – URL: <https://CRAN.R-project.org/package=outliers> (дата обращения 24.12.2024).
10. Eftekhari Z. Antimicrobial properties of medicinal plants; The new therapeutic aspect of *Valeriana officinalis*. // Plant Biotechnol. Persa. – 2020. – Vol. 2, No. 1. – P. 59-60. DOI: 10.29252/pbp.2.1.59
11. Filizadeh Y., Goodarzi G. Essential oils from hairy root cultures and field cultivated roots of valerian (*Valeriana sisymbriifolium*). // J. Med. Plants. – 2010. – Vol. 9, No. 35. – P. 120-128. DOI: 20.1001.1.2717204.2010.9.35.14.4
12. Lai Z., Tsugawa H., Wohlgemuth G., Mehta S., Mueller M., Zheng Y., Ogiwara A., Meissen J., Showalter M., Takeuchi K., Kind T., Beal P., Arita M., Fiehn O. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. // Nat. Methods. – 2018. – Vol. 15. – P. 53-56. DOI: 10.1038/nmeth.451234

13. Liu X., Hu Y., Xue Z. Zhang X., Liu X., Liu G., Wen M., Chen A., Huang B., Li X., Yang N., Wang J. Valtrate, an iridoid compound in *Valeriana*, elicits anti-glioblastoma activity through inhibition of the PDGFRA/MEK/ERK signaling pathway. // J. Transl. Med. – 2023. – Vol. 21. – P. 147. DOI: 10.1186/s12967-023-03984-0
14. Mokhtari A., Omid M., Ebrahimi M., Alizadeh H., Sobhani A., Azadi P., Noormohammadi N., Shafaie M. Optimizing the extract yield of bioactive compounds in *Valeriana officinalis* root: a D-optimal design. // Prep. Biochem. Biotechnol. – 2024. – Vol. 54, No. 6. – P. 838-848. DOI: 10.1080/10826068.2023.2297709
15. Murti K., Kaushik M., Sangwan Y., Kaushik A. Pharmacological properties of *Valeriana officinalis*-a review. // Pharmacology online. – 2011. – Vol. 3. – P. 641-646.
16. Navarrete A., Avula B., Choi Y.W., Khan I.A. Chemical fingerprinting of *Valeriana* species: simultaneous determination of valerianic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. // J. AOAC Int. – 2006. – Vol. 89, No. 1. – P. 8-15. DOI: 10.1093/jaoac/89.1.8
17. r-project.org R Core Team. R: The R Project for Statistical Computing. [Электронный ресурс]. - 2023. - URL: <https://www.r-project.org/> (дата обращения 24.12.2024).
18. Srednicka-Tober D., Hallmann E., Kopczynska K., Goralska-Walczak R., Baranski M., Grycz A., Seidler-Lozykowska K., Rembiałkowska E., Kazimierzczak R. Profile of selected secondary metabolites and antioxidant activity of valerian and lovage grown in organic and low-input conventional system. // Metabolites. – 2022. – Vol. 12, No. 9. – P. 835. DOI: 10.3390/metabo12090835
19. Stacklies W., Redestig H., Scholz M., Walther D., Selbig J. pcaMethods - a Bioconductor package providing PCA methods for incomplete data // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23, No. 9. – P. 1164-1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm069
20. Thakur A., Kumar A., Kumar D., Warghat A.R., Pandey S.S. Physiological and biochemical regulation of *Valeriana jatamansi* Jones. under water stress. // Plant Physiol. Biochem. – 2024. – Vol. 208. – P. 108476. DOI: 10.1016/j.plaphy.2024.108476
21. Thevenot E.A., Roux A., Xu Y., Ezan E., Junot C. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses // J. Proteome Res. – 2015. – Vol. 14, No. 8. – P. 3322-3335. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
22. Wang P. C., Ran X. H., Luo H. R., Ma Q. Y., Liu Y. Q., Zhou J., Zhao Y. X. Phenolic compounds from the roots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*. // J. Braz. Chem. Soc. – 2013. – Vol. 24, No. 9. – P. 1544-1548. DOI: 10.5935/0103-5053.20130184
23. Yemelyanov V.V., Puzanskiy R.K., Shishova M.F. Plant life with and without oxygen: A metabolomics approach // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – Vol. 24, No. 22. – P. 16222. DOI: 10.3390/ijms242216222