

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 76 • № 4 • 2021 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Кузьмин В.С., Каменский А.А. Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных 183
- Гусев А.А., Захарова О.В., Васюкова И.А., Евтушенко Н.А., Васильева С.Г., Лукьянов А.А., Лобакова Е.С., Скрипникова Е.В., Соловченко А.Е. Наночастицы в водной среде: риски и возможности их контроля с помощью микроводорослей 202

Оригинальные исследования

- Сивкина А.Л., Феофанов А.В., Кирпичников М.П., Ахтар М.С., Студитский В.М. Роль белка Nhr6 в разворачивании нуклеосом фактором FACT 213
- Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикочувствительность *Escherichia coli*. 219
- Лазарева А.М., Ипатова В.И., Ильина О.В., Тодоренко Д.А., Маторин Д.Н., Байжуманов А.А. Токсическое влияние микрочастиц пластика на культуру *Scenedesmus quadricauda*: взаимодействие между микрочастицами пластика и водорослью 225
- Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К. Особенности использования 2,6-дихлорофенолиндофенола в качестве акцептора электронов в исследованиях фотосинтеза 234
- Горшкова Д.С., Пожидаева Е.С. Влияние фитогормонов на экспрессию генов *USP* в проростках *Arabidopsis thaliana* 241
- Роговая О.С., Зупник А.О., Измайлова Л.Ш., Воротеляк Е.А. Морфофункциональная характеристика фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы кожи человека 250
- Широких И.Г., Назарова Я.И. Актинобиота ризосферы трансгенных растений табака с повышенной солеустойчивостью 258

Мнения

- Хохлов А.Н. Размышления геронтолога-пессимиста, или почему мы все еще не живем 1000 лет. 266

Краткие сообщения

- Груздев Г.А., Карпухина О.В., Якунин В.Г., Иноземцев А.Н., Савинов В.П., Тимошенко В.Ю., Каменский А.А. Влияние низкотемпературной плазмы атмосферного давления на культуру клеток *Paramecium caudatum*. 273
- Климко А.И., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И., Брюханов А.Л. Ингибирование автоокисления аскорбата новыми штаммами молочнокислых бактерий 278

- Указатель статей, опубликованных в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» в 2021 г. 283

CONTENTS

Reviews

- Kuzmin V.S., Kamensky A.A. The molecular and cellular mechanisms of the heart pacemaker development in vertebrates.183
- Gusev A.A., Zakharova O.V., Vasyukova I.A., Evtushenko N.A., Vasilieva S.G., Lukyanov A.A., Lobakova E.S., Skripnikova E.V., Solovchenko A.E. Nanoparticles in the aquatic environment: the risks associated with them and the possibilities of their mitigation with microalgae 202

Research articles

- Sivkina A.L., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Akhtar M.S., Studitsky V.M. Role of Nhp6 protein in nucleosome unfolding by factor FACT213
- Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tkachenko A.G. Influence of indole on intracellular polyamines and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*219
- Lazareva A.M., Ipatova V.I., Il'ina O.V., Todorenko D.A., Matorin D.N., Baizhumanov A.A. Toxic effects of microplastics on culture *Scenedesmus quadricauda*: interactions between microplastics and algae 225
- Loktyushkin A.V., Lovyagina E.R., Semin B.K. Features of using 2,6-dichlorophenolindophenol as an electron acceptor in photosynthesis studies 234
- Gorshkova D.S., Pojidaeva E.S. The effect of phytohormones on the expression of USP encoding genes in *Arabidopsis thaliana* seedlings.241
- Rogovaya O.S., Zupnik A.O., Izmailova L.Sh., Vorotelyak E.A. Morphofunctional characteristics of fibroblasts of the papillary and reticular layers of the dermis of human skin 250
- Shirokikh I.G., Nazarova Ya.I. Actinobiota in the rhizosphere of transgenic tobacco plants with increased tolerance to salt stress. 258

Opinion articles

- Khokhlov A.N. Reflections of a pessimistic gerontologist or why we still do not live 1000 years 266

Short communications

- Gruzdev G.A., Karpukhina O.V., Yakunin V.G., Inozemtsev A.N., Savinov V.P., Timoshenko V.Yu., Kamensky A.A. Effect of low-temperature atmospheric pressure plasma on *Paramecium caudatum* cell culture273
- Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I., Bryukhanov A.L. Inhibition of ascorbate autoxidation by new strains of lactic acid bacteria 278
- Index of papers published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2021 . . . 284

ОБЗОР

УДК 612.172.2

Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных

В.С. Кузьмин* , А.А. Каменский

Кафедра физиологии человека и животных, биологической факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: kuzmin@mail.bio.msu.ru

Небольшая группа миокардиальных клеток, формирующая естественный доминирующий пейсмейкер (ритмоводитель) сердца в т.н. синоатриальном узле (САУ), обеспечивает автоматическую ритмическую работу сердца животных, включая человека, на протяжении всей жизни. Для пейсмейкера сердца характерна специфическая гистологическая организация, особый паттерн экспрессии множества генов, определяющих электрофизиологический фенотип составляющих его кардиомиоцитов. Функциональное созревание пейсмейкера сердца происходит в ходе всего эмбрионального периода развития, начиная с самых ранних стадий. Понимание закономерностей происхождения ритмоводителя сердца и молекулярных механизмов, контролирующих его развитие, приближает к созданию искусственных биологических пейсмейкеров, осмыслению причин формирования многих сердечно-сосудистых патологий, в особенности – генетически обусловленных, связанных с дефектами развития, или приобретенных нарушений ритма сердца. Исследование эмбриогенеза САУ способствует решению проблемы репрограммирования кардиомиоцитов или соматических клеток с целью клеточной терапии при сердечно-сосудистых заболеваниях, реверсии ремоделирования миокарда. К настоящему времени достигнут значительный прогресс в понимании генетических и молекулярных путей, определяющих идентичность пейсмейкерных клеток и управляющих формированием доминирующего пейсмейкера сердца в ходе онтогенеза. В данном обзоре приведены сведения о ключевых группах транскрипционных факторов, молекулярных регуляторных каскадах (белков BMP, Wnt, Wt1, Slit/Robo, RhoA, подопланин, VEGF, PDGF), участвующих в (эпи)генетическом контроле развития пейсмейкерных кардиомиоцитов и определении их электрофизиологического фенотипа.

Ключевые слова: сердце, пейсмейкер, венозный синус, синоатриальный узел, онтогенез, транскрипционный контроль, автоматия, электрофизиологический фенотип, обзор

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВКП – второе кардиогенное поле
 ВС – венозный синус
 ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
 ПКП – первое кардиогенное поле
 САК – синоатриальный клапан
 САУ – синоатриальный узел
 ТФ – транскрипционный фактор
 ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
 AP-1 (activator protein 1) – гетеродимерный транскрипционный фактор «немедленного ответа»
 BMP (bone morphogenic protein) – костный морфогенетический протеин
 DKK1 (dickkopf-related protein) – белок-ингибитор Wnt-сигнализации семейства Dickkopf
 FGF (fibroblasts growth factor) – фактор роста фибробластов
 Frizzled – семейство мембранных рецепторов Wnt
 HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels) – активируемые гиперполяризацией, управляемые циклическими нуклеотидами катионные каналы
 I_f (funny current) – «пейсмейкерный» катионный деполярирующий ток, формируемый каналами семейства HCN

Isl1 – гомеодоменный транскрипционный фактор, содержащий LIM-домен, известный как энхансер гена инсулина
 JNK – киназа c-Jun
 Mef2c (myocyte enhancer factor 2) – миоцит-специфический энхансерный фактор-2
 MesP1 (mesoderm posterior 1 homolog) – мезодермальный транскрипционный фактор
 Nkx2.5 (NK2 гомеобокс 5) – гомеодоменный транскрипционный фактор
 PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста
 Pitx2c (paired-like homeodomain 2) – гомеодоменный транскрипционный фактор
 Raldh2 – ретинальдегид дегидрогеназа 2
 RhoA – белок А гомологов семейства Ras
 Robo (roundabout) – рецепторы семейства «круговых перекрестков»
 Shox2 – гомеобоксный транскрипционный фактор, ассоциированный с низкорослостью
 TBX – транскрипционные факторы семейства T-box
 VEGF – (vascular endothelial growth factor) эндотелиальный фактор роста сосудов
 Wt1 (Wilms tumor 1) – супрессор нефробластомы Вильмса; транскрипционный фактор

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение	184
2. Морфогенез пейсмекера сердца	185
2.1. Ранние этапы кардиогенеза	185
2.2. Автоматическая активность первичной сердечной трубки	185
2.3. Второе кардиогенное поле как источник прокардиогенных клеток-предшественников венозного полюса сердца	187
2.4. Молекулярные маркеры мезодермы кардиогенных полей и САУ	187
2.5. Морфогенез венозного синуса	188
2.6. Атриализация венозного синуса у млекопитающих животных	188
2.7. Формирование дефинитивного пейсмекера сердца у позвоночных животных	189
2.8. Асимметричная локализация САУ у млекопитающих	190
3. Молекулярный контроль генетических программ эмбриогенеза венозного синуса и САУ	191
3.1. Транскрипционные факторы Nkx2.5/GATA4/TBX5 и Shox2 в контроле развития венозного синуса и САУ	191
3.2. Миокардиальные морфогены семейства BMP	191
3.3. Сигнальные белки семейства Wnt; Wnt/ β -катениновый и Wnt/JNK-путь в морфогенезе САУ	192
3.4. Белок Wt1	192
3.5. Сигнальный каскад Slit/Robo	193
3.6. Подопланин	194
3.7. Сигнальный каскад малых ГТФаз RhoA/Rock	194
3.8. Эндотелиальный фактор роста сосудов	194
3.9. Фактор роста тромбоцитов	195
Список литературы	196

1. Введение

Сердце обеспечивает циркуляцию крови в организме на протяжении всей жизни, начиная с самых ранних этапов пренатального онтогенеза. Насосная функция сердца реализуется за счет ритмического координированного чередования возбуждения, сокращения и расслабления его камер. Ритмическое возбуждение сердца возможно благодаря небольшой группе миоцитов, обладающих особыми электрофизиологическими свойствами. Для всех позвоночных животных характерен миогенный тип автоматии сердца. У млекопитающих животных эти специализированные кардиомиоциты располагаются в стенке правого предсердия между устьями верхней (правой крапильной) и нижней (задней) полых вен, формируя доминантный пейсмекер (или «ритмоводитель») сердца, называемый по месту его локализации синоатриальным узлом (далее САУ).

Формирование пейсмекера сердца в ходе эмбриогенеза критически важно для его нормальной работы и выживания организма. Онтогенетические нарушения формирования пейсмекерной функции сопряжены со множеством патологий сердечно-сосудистой системы. К настоящему времени многие аспекты регуляции развития пейсмекера сердца, становления специфического «электрофизиологического фенотипа» его миоцитов раскрыты. В данном обзоре рассмотрены молекулярные механизмы, определяющие формирование и становление пейсмекерной функции в ходе онтогенеза. Следует отметить, что дефинитивный

пейсмекер САУ является сложной тканевой структурой, включающей специализированные «пейсмекерные» кардиомиоциты, элементы соединительной ткани и резидентные иммунные клетки. Будут приведены сведения, касающиеся только онтогенеза миокардиальной составляющей пейсмекера сердца, хотя несомненно, что остальные клеточные составляющие, служащие элементами микроокружения пейсмекерных кардиомиоцитов, влияют на его развитие и функцию [1].

Кардиогенез является многоэтапным процессом, в который вовлечены несколько структур, являющихся источником клеток-предшественников кардиомиоцитов, и различается на поздних этапах эмбрионального развития у разных позвоночных животных. Поэтому анатомическая организация дефинитивного пейсмекера сердца в классе позвоночных животных кажется многообразной и в ряде случаев не до конца изучена: у костистых рыб пейсмекером является кольцевая структура, окружающая синоатриальный клапан (САК); у амфибий пейсмекерными свойствами обладают участки стенки венозного синуса (ВС). Тем не менее ранние этапы кардиогенеза и эмбриогенеза пейсмекера у низших позвоночных (эктотермов), птиц и млекопитающих в значительной степени сходны [2]. Подавляющая часть данных о транскрипционном и молекулярном контроле развития пейсмекера получена при использовании эмбрионов курицы или мыши. Как оказалось, механизмы, регулирующие развитие пейсмекера сердца, консервативны среди амниот и, вероятно, среди

всех позвоночных животных, так как определяются одинаковыми (эпи)генетическими программами и группами регуляторных факторов. Поэтому представленные ниже результаты экспериментальных исследований могут быть распространены на всех позвоночных животных и транслированы на онтогенез САУ человека [3, 4].

2. Морфогенез пейсмейкера сердца

2.1. Ранние этапы кардиогенеза

Освещение вопроса формирования пейсмейкера сердца невозможно без рассмотрения раннего эмбрионального кардиогенеза. Сердце у всех позвоночных животных имеет мезодермальное происхождение. Мультипотентные клетки-предшественники сердца определяются на самых ранних этапах эмбриогенеза. У всех амниот, и у млекопитающих, в частности, индукция и спецификация кардиогенных клеток происходят на стадии формирования эпибласта («зародышевого щитка»). Кардиогенные клетки, являющиеся предшественниками как кардиомиоцитов, так и гладкомышечных клеток и эндотелиоцитов, теряя белки клеточных контактов (например, E-кадгерин) [5], под действием продуктов генов «заднего конца тела» – *Nodal* и *Vg1* и т.д. [6], сигнальных каскадов, активируемых белками семейства *Wnt* [7, 8], *BMP* [9], ряда других морфогенетических факторов (*FGF-1, 2, 8*) [10], мигрируют из двух симметричных, билатерально расположенных участков эпибласта через стенки первичной бороздки и гензеновского узелка в пространство над формирующейся энтодермой, где становятся кардиогенной частью мезодермы. У человека билатерально симметричные кардиогенные участки мезодермы слиты по срединной линии в серпообразную структуру – «сердечный полумесяц», или «серп» [11]. После миграции кардиогенные клетки остаются тесно сближенными с энтодермой, которая продуцирует «кардиогенные» факторы.

При дальнейшем развитии кардиогенные клетки локализуются в передней части висцерального листка бокового (латерального) отдела мезодермы. Вскоре после формирования висцеральной кардиогенной мезодермы в ней идентифицируются т.н. кардиогенные поля – *первое и второе*, согласно классическим представлениям. Мезодермальные и мезенхимальные клетки, происходящие из билатеральных участков первого кардиогенного поля (ПКП), формируют *первичную сердечную трубку*, характерную для всех позвоночных животных [12]. Объединение двух мезодермальных зачатков приводит к тому, что сердечная трубка оказывается окружена перикардальной (целомической) полостью. Удлинение и утолщение стенок сердечной трубки, формирование отделов сердца происходят за счет включения выселяющихся и дифференцирующихся ме-

зенхимальных клеток из висцеральной мезодермы. Миграция клеток мезодермы становится возможной благодаря их «деэпителизации» — индукции т.н. эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Рабочий миокард левого желудочка, часть миокарда правого и левого предсердий зрелого сердца, но не пейсмейкерный миокард ВС или САУ являются производными первичной сердечной трубки, то есть формируются за счет мезодермы, происходящей из ПКП.

2.2. Автоматическая активность первичной сердечной трубки

Сердце является органом, наиболее рано в онтогенезе проявляющим свою функцию. Непосредственно после объединения мезодермальных зачатков в сердечный полумесяц в слабо дифференцированных кардиомиоцитах («кардиобластах») начинается сборка саркомеров, экспрессия мембранных ионных переносчиков и ионных каналов, в частности, белков натрий-кальциевого обменника, белков кальциевых каналов L-типа. Кардиогенные клетки у мыши уже на стадии E7.75-E8 демонстрируют способность к автоматической активности – спонтанно, ритмически генерируют цитоплазматические Ca^{2+} -волны и, соответственно, потенциалы действия [13]. Позже, после формирования сердечной трубки, «первичный» миокард, состоящий всего лишь из двух-трех клеточных слоев, проявляет способность спонтанно сокращаться [14]. Спонтанная электрическая активность возникает при этом в области венозного (заднего) конца, индуцируя сокращения перистальтического характера, что определяет направленное движение крови от приносящего к выносящему тракту сердечной трубки [15]. Считается, что предрасположенность к начальной активации венозного конца сердечной трубки обусловлена кранио-каудальным градиентом концентрации морфогенетических факторов – ретиноевой кислоты, синтезируемой задней мезодермой; градиентом активности белков семейства *Wnt, BMP, FGF* [16].

Автоматия сердечной трубки никак не связана с активностью неких зачатков пейсмейкера зрелого сердца (САК, САУ). В настоящее время, в противоположность взглядам, сформировавшимся в 1990-х гг., установлено, что первичная сердечная трубка не содержит всех элементов зрелого сердца, в том числе и зачатков пейсмейкера сердца в «миниатюрном» виде [17]. Миоциты как сердечной трубки, так и САУ экспрессируют активируемые гиперполяризацией, управляемые циклическими нуклеотидами ионные каналы (HCN), формирующие «пейсмейкерный» ток I_f [18, 19]. Деполяризующий ионный ток I_f [20], обусловленный преимущественно HNC4, является одним из механизмов, обеспечивающих т.н. медленную

диастолическую деполяризацию, делающую возможным спонтанное возникновение потенциалов действия в пейсмекерных клетках [21, 22]. Кра́нио-каудальный градиент экспрессии HCN4 наблюдается уже на стадии сердечного серпа еще до формирования сердечной трубки [19].

Кардиомициты первичной сердечной трубки экспрессируют гомеодоменные транскрипционные факторы (ТФ), такие как Nkx2.5, Isl1 (Isl1 – транскрипционный фактор, содержащий LIM-домен), GATA-связывающие ТФ, например, GATA4, а также транскрипционные факторы семейства Т-box (TBX), например – TBX5.

Промиокардиальные клетки, происходящие из мезодермы ПКП, являются Nkx2.5-, Isl1-положительными, в то время как САУ происходит из группы клеток, являющихся Nkx2.5-, Isl1-негативными (рис. 1). Комплекс ТФ Nkx2.5/TBX5/GATA4 является ключевым для активации транскрипции генов, определяющих сократительные и электрофизиологические свойства, характерные для «рабочего» миокарда. Nkx2.5/TBX5/GATA4 вызывают подавление экспрессии каналов семейства HCN,

но стимулируют экспрессию генов белков сократительного аппарата, а также генов коннексинов высокой проводимости Cx40 (*Gja1*) и Cx43 (*Gja5*), потенциал-чувствительных натриевых каналов NaV1.5 (*Scn5a*), генов калиевых каналов Kir2.x (*Kcnj2*, *Kcnj12*). Каналы Kir2.x проводят калиевый ионный ток аномального выпрямления, который стабилизирует потенциал покоя и препятствует автоматической активности в кардиомиоцитах [23]. Как упомянуто выше, промиокардиальные клетки сердечной трубки в результате пролиферации формируют рабочий миокард левого желудочка и предсердий.

Предполагается, что в сердечной трубке репрессоры транскрипции TBX2, TBX3 до определенного момента кардиогенеза, а именно до начала формирования ВС, препятствуют работе комплекса Nkx2.5/TBX5/GATA4, а экспрессию HCN4 поддерживает Isl1 [24]. Следует отметить, что HCN-положительные клетки сердечной трубки экспрессируют также коннексины Cx40, характерные для рабочих кардиомиоцитов предсердий и желудочков [20], но не для САУ.

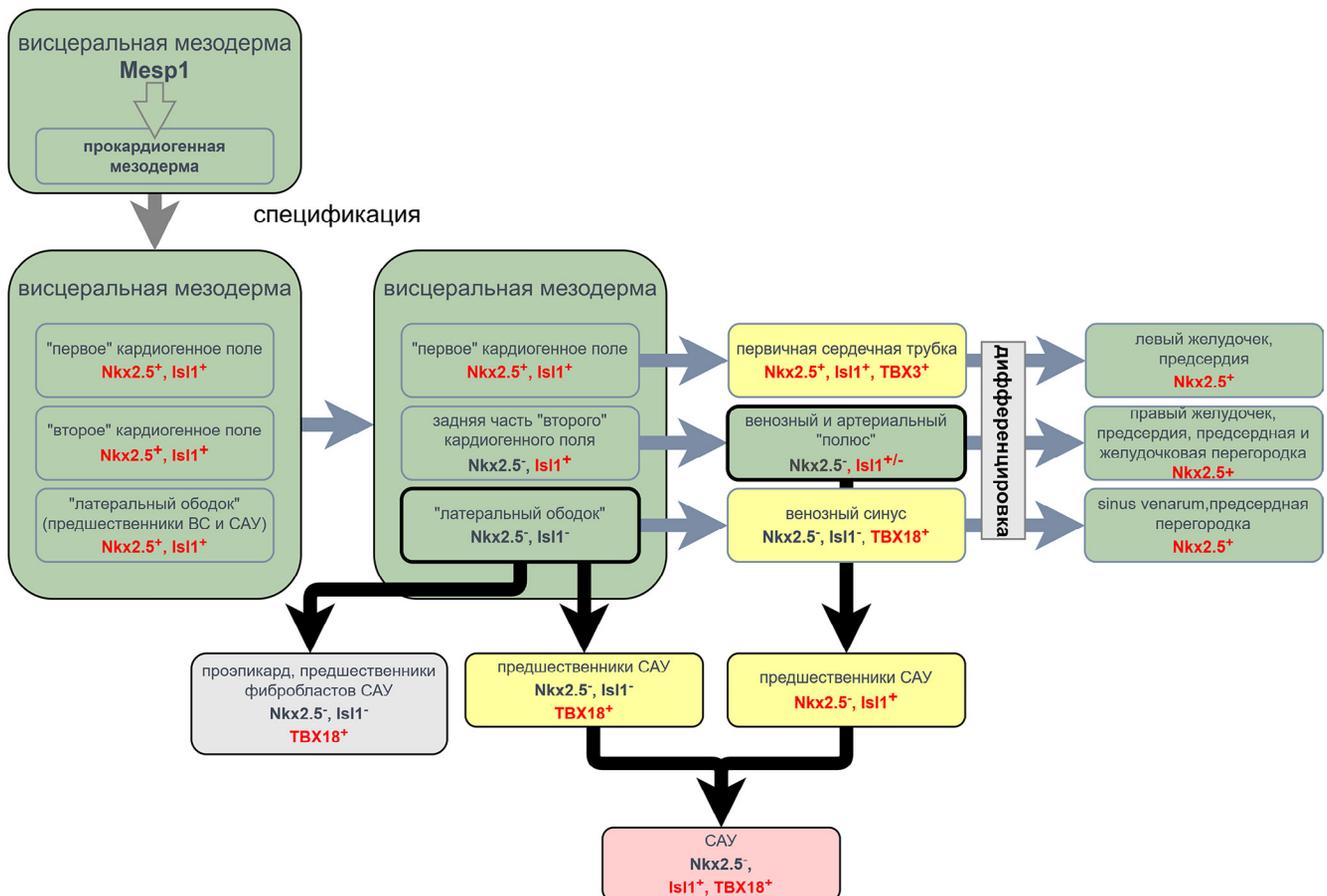


Рис. 1. Происхождение специализированных пейсмекерных кардиомиоцитов синоатриального узла (САУ) из мезодермальных кардиогенных полей в ходе эмбрионального развития, а также паттерн экспрессии ключевых транскрипционных факторов (ТФ: Mesp1, Nkx2.5, Isl1, TBX18, TBX3) в мезодермальных кардиогенных полях и происходящих из них клетках на разных этапах кардиогенеза у млекопитающих животных. Мезенхимальные предшественники, зрелые кардиомиоциты, а также фибробласты САУ, вероятно, происходят из двух пулов (Nkx2.5⁺/Isl1⁻/TBX18⁺ и Isl1⁺/Nkx2.5⁻) мезодермальных клеток.

Желтым и красным цветом показаны структуры, демонстрирующие автоматическую или пейсмекерную активность на разных этапах кардиогенеза. Экспрессируемый ТФ показан красным шрифтом; отсутствие экспрессии ТФ показано темным шрифтом.

Таким образом, для наиболее рано дифференцирующихся миоцитов сердечной трубки и кардиомиоцитов САУ характерен различный паттерн экспрессии ТФ, контролирующих электрофизиологические свойства. Кардиомиоциты первичной сердечной трубки не участвуют в автоматии, обеспечиваемой эмбриональным ВС или зрелым САУ [25]. Клетки-предшественники САУ обнаруживаются в эмбриональном сердце гораздо позже момента инициации спонтанных сокращений сердечной трубки.

2.3. Второе кардиогенное поле как источник прокардиогенных клеток-предшественников венозного полюса сердца

Одним из мезодермальных участков, служащих источником клеток-предшественников кардиомиоцитов, является *второе кардиогенное поле* (ВКП) [11, 26, 27]. Прокардиогенные клетки-предшественники мезодермы ВКП у млекопитающих идентифицируются уже в эпибласте. Мезодермальные билатерально симметричные участки ВКП располагаются медиальнее серповидной зоны первого поля [28]. Формирование кардиогенных мезенхимальных клеток из мезодермы ВКП за счет ЭМП, а также их миграция, пролиферация [29] и дифференцировка в кардиомиоциты в ходе онтогенеза происходят существенно дольше и позже, чем в ПКП. Мезенхимальные клетки выселяются из ВКП тогда, когда миграция клеток-предшественников первого поля уже закончена, они включены в стенку сердечной трубки и их дифференцировка направлена по миокардиальному пути. Формирование новых отделов сердца происходит за счет иммиграции клеток ВКП и соответствует началу фазы петлеобразного искривления сердечной трубки. Целый ряд структур сердца, включая ВС, САК, атриовентрикулярное соединение, правый желудочек и желудочковую перегородку, часть предсердий, предсердную перегородку, миокардиальную ткань стенки легочных и полых вен, формируется за счет мезенхимальных предшественников ВКП [30, 31].

Первичная сердечная трубка, располагаясь в целомической полости, остается связанной с висцеральной мезодермой посредством т.н. *дорзальной кардиогенной мезодермы* (или *дорзального мезокардия*) — продольного мезодермального тяжа, который формируется как результат преобразования ВКП. Позднее дорзальный мезодермальный тяж частично отделяется от сердечной трубки, сохраняя с ней связь только в области артериального и венозного концов (полюсов) и формируя, таким образом, передний и задний участки дорзальной мезодермы. Клетки этих двух зон активно делятся, мигрируют в область артериального и венозного полюсов сердечной трубки, где пролиферируют и дифференцируются в кардиомиоциты [32]. Согласно классическим представ-

лениям, формирование структур «венозного» и «артериального» полюсов эмбрионального сердца позвоночных происходит за счет переднего и заднего кардиогенных полей — отделов ВКП [28, 33]. Мезенхимальные клетки, выселяющиеся из заднего кардиогенного поля, начинают встраиваться в стенку первичной сердечной трубки позже, чем клетки переднего поля, поэтому структуры венозного полюса сердца, включая ВС, развиваются позже (у мышей — начиная с E9,5), чем структуры артериального полюса сердца [17].

Считалось, что заднее кардиогенное поле гомогенно и его клетки служат источником для всех структур венозного полюса сердца, включая эмбриональный ВС и САУ [34]. В настоящее время показано, что висцеральная мезодерма до стадии выделения полей более гетерогенна, чем предполагалось ранее, и в ней уже присутствуют отдельные группы прокардиогенных клеток, являющиеся предшественниками кардиомиоцитов только ВС или только САУ [35].

2.4. Молекулярные маркеры мезодермы кардиогенных полей и САУ

В настоящее время MesP1 рассматривается как ключевой фактор кардиогенной спецификации и пролиферации мезодермы (рис. 1) [36]. Предполагается, что именно MesP1 управляет группой регуляторных факторов, необходимых для раннего кардиогенеза. К MesP1-управляемым ТФ и регуляторным белкам относятся FGF8, FGF10, Isl1, Id2, GATA4/6, Mef2c, подоплантин, ТФ семейства TBX [37]. Клетки как ПКП, так и ВКП экспрессируют MesP1 и ТФ семейства GATA [38].

Множество факторов участвуют в транскрипционном контроле пролиферации и дифференцировки мезенхимальных клеток кардиогенной мезодермы. Однако ключевыми ТФ в определении судьбы кардиогенных клеток и их электрофизиологического фенотипа являются Nkx2.5, GATA4, Isl1, TBX2, 3, 5, 18, 20. В настоящее время установлено, что исходно все кардиогенные клетки висцеральной мезодермы экспрессируют Nkx2.5 [35]. Маркером всех мезенхимальных предшественников кардиомиоцитов является также Isl1 [24, 29, 30]. Таким образом, все прокардиогенные клетки кардиогенных полей изначально являются Isl1- и Nkx2.5-позитивными [39]. Ранее предполагалось, что клетки второго поля и, соответственно, клетки-предшественники ВС являются исходно Nkx2.5-негативными [40].

Еще до формирования сердечной трубки кардиогенная мезодерма разделяется на субпопуляции клеток, т.е. подвергается «паттернингу», по набору экспрессируемых ТФ. Мезодерма ПКП сохраняет экспрессию Isl1 и Nkx2.5 (однако после окончания формирования первичной сердечной трубки экспрессия Isl1 в кардиомиоцитах — «наследниках» первого поля — пропадает). Мезодерма

ВКП сохраняет экспрессию только *Isl1*, однако перед дифференцировкой клетки второго поля заново начинают экспрессировать *Nkx2.5*, а уровень *Isl1*, наоборот, снижается. Таким образом, классификация кардиогенных полей является весьма условной и они могут быть рассмотрены как домены мезодермы с меняющимся сложным образом в ходе эмбрионального развития профилем ТФ [35]. Именно паттерн экспрессии ТФ обуславливает спецификацию мезодермальных клеток как предшественников пейсмекерных кардиомиоцитов САУ или рабочих кардиомиоцитов предсердий и желудочков.

Происхождение пейсмекера сердца можно установить, проследив профиль экспрессии ТФ в кардиомиоцитах зрелого САУ и в клетках-предшественниках кардиогенной мезодермы. Установлено, что небольшая клеточная субпопуляция из периферии мезодермы сердечного полумесяца (т.н. *латерального ободка*) теряет экспрессию как *Isl1*, так и *Nkx2.5* до начала ЭМП и пролиферации мезенхимальных клеток, но начинает экспрессировать *TBX18*. Такие *Nkx2.5*⁻, *Isl1*-негативные, но *TBX18*-позитивные (*Nkx2.5*⁻/*Isl1*⁻/*TBX18*⁺) клетки являются предшественниками ВС и, возможно, предшественниками пейсмекера всех позвоночных животных. Показано, что у млекопитающих миокард САУ образован клетками, происходящими из двух разных субпопуляций: (1) *Isl1*-позитивными и *Nkx2.5*-негативными (*Isl1*⁺/*Nkx2.5*⁻) клетками второго (заднего) кардиогенного поля; (2) *Nkx2.5*⁻/*Isl1*⁻/*TBX18*⁺-клетками «латерального ободка» [35] (рис. 1). Важно, что клетки дефинитивного САУ сохраняют экспрессию ТФ *Isl1*, который, вероятно, необходим для поддержания пейсмекерного фенотипа и экспрессии *HCN4*. Кроме того, *Nkx2.5*⁻/*Isl1*⁻/*TBX18*⁺-клетки являются также предшественниками эпикарда, ткани коронарных сосудов, а также фибробластов сердца, которые играют важную роль в реализации функции САУ.

В настоящее время экспериментально подтверждено, что именно та часть мезенхимальных клеток, которая экспрессирует *TBX18*, мигрирует, пролиферирует и дифференцируется в кардиомиоциты примордиального САУ и составляет большую часть (75% клеток) зрелого САУ [20] млекопитающих, а удаление этих клеток на ранних эмбриональных этапах приводит к тому, что САУ не формируется.

2.5. Морфогенез венозного синуса

Венозный синус (*sinus venosus*) является первой структурой в ходе эмбрионального развития сердца, которую можно выделить в качестве отдельной камеры. У всех позвоночных животных ВС сначала отделен от формирующегося общего предсердия синоатриальным каналом, который преобразуется в САК. ВС формируется в результа-

те миокардиализации — иммиграции и встраивания мезенхимальных клеток, происходящих из ВКП, в стенку проксимальных отделов общих (правой и левой) кардинальных вен и/или самого каудального отдела сердечной трубки. В результате миокардиализации кардинальных вен образуются симметричные удлинённые отделы — т.н. рога ВС, которые и составляют его основной объем у некоторых животных — например, млекопитающих [41, 42].

У млекопитающих ВС является временной эмбриональной структурой. В пренатальный период ВС редуцируется таким образом, что его левый рог преобразуется в коронарный синус, служащий дренажем коронарных вен. Правый рог ВС у млекопитающих включается в результате процесса, именуемого атриализацией [24], в состав стенки правого предсердия. Предполагается, что небольшая часть миокарда ВС включается также в состав стенки левого предсердия. Передние и задние кардинальные вены, приносящие кровь в ВС на эмбриональных стадиях, преобразуются в верхние полые (краниальные) и непарные вены соответственно [43]. САУ является структурой, которая формируется у всех млекопитающих на основе венозного синуса.

2.6. Атриализация венозного синуса у млекопитающих животных

В результате атриализации венозного синуса САК, включающий две створки, претерпевает существенную перестройку. Створки САК в эмбриогенезе расходятся и частично редуцируются: правая створка САК включается в стенку правого предсердия и разделяет его гладкостенную и trabeculyarizovannuyu части, сохраняясь в форме борозды — «пограничного гребешка» (*crista terminalis*). Часть правой створки САК также формирует евстахиев клапан. Левая створка САК включается в предсердную перегородку с правой ее стороны. В итоге стенка правого рога ВС преобразуется у млекопитающих в часть стенки правого предсердия, располагающуюся между пограничным гребешком и предсердной перегородкой (т.н. *sinus venarum*). У некоторых млекопитающих, например мышей, инкорпорация ВС происходит не полностью, в результате чего устья полых вен открываются в частично отделенное от правого предсердия пространство [44].

В целом ряде исследований в результате функциональных экспериментов показано, что в период пренатального развития от момента окончания петлеобразного изгибания сердечной трубки и до момента окончания атриализации ВС роль пейсмекера сердца выполняет не локализованная, четко ограниченная структура, а участок, включающий миокард ВС и кардинальных вен [43]. Следует отметить, что миокард как кардинальных вен, так и всего ВС экспрессирует

HCN4-каналы вплоть до позднего пренатального периода [45, 46]. Таким образом, у разных видов млекопитающих функцию эмбрионального пейсмекера может брать на себя распределенная область в комплексе ВС и кардинальных вен за пределами развивающегося САУ [47, 48].

2.7. Формирование дефинитивного пейсмекера сердца у позвоночных животных

У низших позвоночных животных редукция ВС в ходе онтогенеза не происходит, а его атриализация может носить только функциональный характер. Видимо, у амфибий роль дефинитивного пейсмекера выполняет весь миокард ВС, происходящий из $Nkx2.5^-/Isl1^-/TBX18^+$ -клеток, в которых к концу эмбрионального развития повышается экспрессия $Isl1$. У других эктотермов функциональная атриализация ВС приводит к тому, что кардиомиоциты большей части венозного синуса замещаются фибробластами (костистые рыбы) либо они теряют способность к автоматии (рептилии). В таком случае, способность к автоматии сохраняет только круговой участок миокарда на периферии САК [23].

У млекопитающих после миграции из кардио-генных полей мезенхимальные $Isl1^+/Nkx2.5^-$ - и $Nkx2.5^-/Isl1^-/TBX18^+$ -предшественники САУ локализируются в области устьев правой и/или левой общих кардинальных вен, т.е. в основании рогов ВС. Предполагается, что популяция клеток-предшественников САУ не смешивается с предшественниками собственно ВС, что исключает его клеточную мозаичность. У мышей примордиальный САУ развивается как утолщение основания стенки правого рога ВС в период E10.5-E14.5. В этой зоне отсутствует экспрессия *Gja1* (кодирующего коннексин $Sx40$), но наблюдается экспрессия «пропейсмекерных» ТФ [49]. В результате атриализации ВС участок миокарда в основании кардинальных вен, включающий примордиальный САУ, встраивается в стенку правого предсердия и дефинитивный САУ обнаруживается в межвенной области.

В ходе позднего пренатального — возможно, у некоторых млекопитающих и раннего постнатального — онтогенеза область миокарда, способная к автоматической активности и включающая кардинальные вены, ВС и САУ, уменьшается за счет снижения уровня экспрессии HCN4 и усиления экспрессии белков рабочего электрофизиологического фенотипа. Иными словами, в ходе развития происходит компактизация пейсмекера сердца, а атриализация имеет не только морфологический, но и функциональный характер [48]. Установлено, что у крыс на ранних этапах постнатального онтогенеза миокардиальная ткань краниальных (передних) полых вен характеризуется деполяризованным и нестабильным потенциалом покоя, низкой скоростью проведения возбуждения, слабой электри-

ческой взаимосвязью кардиомиоцитов, то есть частично демонстрирует свойства пейсмекерного миокарда. Эти особенности обусловлены пониженной экспрессией белков калиевых ионных каналов аномального выпрямления $Kir2.x$, а также высокопроводящих белков щелевых контактов $Sx43$. Миокардиальная ткань полых вен происходит из той же группы клеток, что и кардиомиоциты эмбриональных кардинальных вен и ВС. В постнатальном онтогенезе миокардиальная обкладка передних кардинальных вен, являющаяся фактически продолжением стенки ВС, преобразуется в миокардиальную обкладку краниальных полых вен. В ходе онтогенеза экспрессия $Kir2.x$ и $Sx43$ в полых венах увеличивается, а электрофизиологические свойства этой ткани приближаются к таковым в рабочем миокарде [48]. Возможно, что постнатальная атриализация миокарда полых вен характерна и для крупных млекопитающих, включая человека. Локализация, компактизация и изоляция миокарда, способного к автоматии, в ходе развития способствует реализации функции зрелого САУ у млекопитающих — генерации ритма частотой до 10 Гц. Напротив, неполная атриализация или задержка преобразования электрофизиологического фенотипа может способствовать эктопической активности в миокарде полых вен, приводить к аритмиям, феноменологически ассоциированным с пороками развития.

Показано, что у млекопитающих атриализация ВС и компактизация САУ обусловлены изменением паттерна экспрессии ТФ, в первую очередь — появлением $Nkx2.5/GATA4$ в комплексе с транскрипционным активатором $TBX5$ в $Nkx2.5$ -негативных клетках [29, 50]. Прямо установлено, что уровень экспрессии $Nkx2.5$ значительно повышается (хотя и не до уровня, наблюдаемого в рабочем миокарде) в ходе онтогенеза в миокардиальной ткани полых вен. У крыс, а возможно и у других млекопитающих, повышение экспрессии указанных ТФ происходит одновременно с формированием симпатической иннервации и, вероятно, обусловлено секрецией норадреналина и трофических факторов адренергическими волокнами. Как указано выше, комплекс $Nkx2.5/TBX5/GATA4$ определяет дифференцировку предшественников кардиомиоцитов по пути рабочего (предсердного) миокарда [20]. Известно, что наиболее часто источником эктопической активности, приводящей к фибрилляции предсердий, является миокард легочных вен. Ранее показано, что в ходе постнатального развития уровень экспрессии $Nkx2.5$ в легочных венах, в противоположность полым, снижается, что, вероятно, делает эту ткань более аритмогенной за счет потери «рабочих» и усиления пейсмекерных характеристик [50]. Таким образом, ТФ, участвующие в формировании САУ, играют роль и в индукции патологический явлений — нарушений ритма сердца.

Развивающийся САУ оказывается защищен от программы атриализации. Одним из механизмов данной защиты является высокий уровень экспрессии репрессора транскрипции, способствующего активации «пропейсмекерной» генетической программы, TBX3 [51, 52] – антагониста Nkx2.5/TBX5/GATA4 [53, 54]. TBX3-позитивные кардиомиоциты венозного полюса сердца демонстрируют автоматическую активность, в отличие от TBX3-негативных. Установлено, что TBX3 дозозависимо подавляет экспрессию белков, определяющих рабочий электрофизиологический фенотип, а также может репрограммировать рабочие кардиомиоциты в пейсмекерные [55]. Уменьшение экспрессии TBX3 ниже некоего порогового уровня приводит к тому, что клетки-предшествен-

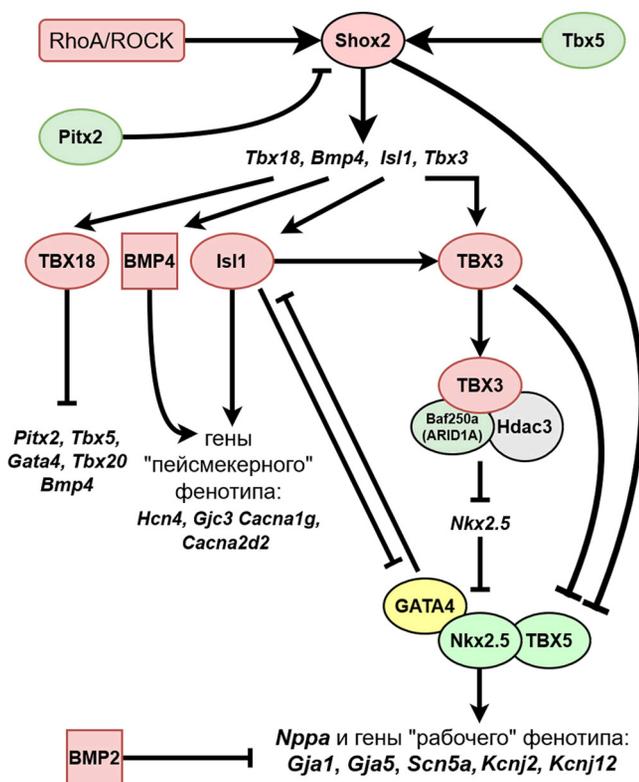


Рис. 2. Гипотетическая схема взаимодействия и иерархия транскрипционных факторов, морфогенетических белков и сигнальных каскадов, определяющих формирование в ходе эмбриогенеза кардиомиоцитов с пейсмекерным электрофизиологическим фенотипом в синоатриальном узле (САУ) млекопитающих. «Пропейсмекерные» факторы показаны красным цветом; факторы, направляющие дифференцировку кардиомиоцитов по рабочему типу (т.е. придающие свойства рабочего миокарда), показаны зеленым цветом. *Hcn4, Gjc3, Casna1g, Casna2d2* – гены белков (HCN4-каналов, коннексина Cx30.2, α -субъединицы кальциевого потенциалчувствительного ионного канала Cav3.1, субъединицы $\alpha 2\delta 2$ кальциевого потенциал-чувствительного канала, соответственно), специфических для пейсмекерных кардиомиоцитов САУ. *Nppa, Gja1, Gja5, Scn5a, Kcnj2, Kcnj12* – гены белков (предсердного натрийуретического пептида, коннексинов Cx40, Cx43, натриевого потенциалчувствительного канала Nav1.5, калиевых каналов аномального выпрямления Kir2.1, Kir2.2 соответственно), специфических для рабочих кардиомиоцитов предсердий.

ники САУ дифференцируются в рабочие кардиомиоциты. Подавление экспрессии TBX3 в ходе кардиогенеза приводит к гипоплазии САУ, брадикардии или брадиаритмиям у экспериментальных животных.

Эпигенетический транскрипционный контроль с участием TBX3 реализуется за счет того, что этот ТФ формирует гетерокомплекс, включающий белок Baf250a (ARID1A) и одну из гистондеацетилаз (Hdac3), который деацетилирует гистоны локуса Nkx2.5, тем самым подавляя экспрессию этого ТФ [56]. Считается, что одним из активаторов экспрессии TBX3 является *Isl1* (рис. 2).

Предполагается, что TBX3 недостаточен для формирования САУ, и, как указано выше, основным ТФ, который определяет судьбу клеток-предшественников САУ, является TBX18 [40]. TBX18 необходим для спецификации и локализации отдельного клона мезенхимальных клеток в мезодерме, а также дифференцировки клеток-предшественников в кардиомиоциты ВС и САУ. Дополнительным фактором, который, возможно, принимает участие в спецификации предшественников САУ и подавлении экспрессии генов рабочего фенотипа, является репрессор TBX2 [57].

Вероятно, неполная атриализация ВС и компактизация САУ в ходе пре- и постнатального развития, которая может приводить к эктопической аритмогенной автоматии в миокардиальной обкладке полых вен, связана с недостаточной экспрессией Nkx2-5, а также неполным подавлением экспрессии TBX2, TBX3, TBX18. Показано, что миокард полых вен взрослых млекопитающих при активации аднерорецепторов $\alpha 1$ -типа, по крайней мере, у крыс, демонстрирует некоторые свойства, характерные для пейсмекерного миокарда [58]. Таким образом, причиной аритмогенного действия $\alpha 1$ -аднергической стимуляции в некоторых участках наджелудочкового миокарда может являться «пейсмекерный» профиль экспрессии ТФ.

2.8. Асимметричная локализация САУ у млекопитающих

В настоящее время предполагается, что висцеральная кардиогенная мезодерма уже на стадии выделения кардиогенных полей является билатерально асимметричной. Показано, что задний отдел ВКП вносит разный вклад в билатеральные части эмбрионального сердца [59]. Одной из причин правостороннего расположения дефинитивного САУ может быть асимметричная миграция мезенхимальных клеток-предшественников из кардиогенных полей.

У млекопитающих в процессе атриализации ВС часть предшественников кардиомиоцитов САУ может оказаться в основании левой кардинальной вены и затем – в составе стенки левого предсердия. Такие клетки могут являться основой для патологического «левостороннего» пейсмеке-

ра сердца, сохраняющегося в эмбриональный период, либо даже в постнатальной жизни. В норме формирование «левостороннего» пейсмекера подавляется, и роль естественного дефинитивного ритмоводителя сердца берет на себя САУ в стенке правого предсердия. Ключевым ТФ, подавляющим развитие пейсмекерного миокарда в левом роге ВС и левом предсердии, является Pitx2с. Он управляет формированием билатеральной асимметрии и является элементом сигнального пути Nodal/Lefty/Pitx2 [20, 60]. Этот ТФ в левом предсердии является прямым репрессором «пропейсмекерного» TBX3, а также Shox2 [61].

3. Молекулярный контроль генетических программ эмбриогенеза венозного синуса и САУ

Роль пейсмекера сердца на разных этапах онтогенеза берут на себя различные структуры, включая каудальный участок первичной сердечной трубки, ВС или его отделы и, наконец, дефинитивный САУ (у млекопитающих). Генетический и транскрипционный контроль онтогенеза пейсмекера сердца обусловлен сложным, эпистатическим или «сетевым», взаимодействием множества факторов, определяющих активацию миогенной программы в мезенхимальных предшественниках, регуляцию их миграции и пролиферации, дифференцировку и контроль электрофизиологического фенотипа. Одни и те же факторы могут регулировать кардиогенез на самых ранних этапах эмбрионального развития – стадии индукции кардиогенной ткани – и терминальную дифференцировку кардиомиоцитов в пренатальный период, что усложняет исследование молекулярных механизмов пространственно-временного контроля развития пейсмекерных структур. Тем не менее роль отдельных сигнальных молекулярных каскадов на критических этапах формирования пейсмекера сердца выяснена, что продемонстрировано далее в настоящем обзоре.

3.1. Транскрипционные факторы Nkx2.5/GATA4/TBX3 и Shox2 в контроле развития венозного синуса и САУ

Гомеодоменный белок семейства NK-2 – Nkx2.5 – функционирует в виде димера с GATA4; Nkx2.5 и GATA4 являются реципрокными коактивирующими факторами [62]. Помимо GATA4 функционирование Nkx2.5 контролируется целым рядом белков семейства T-бокс. TBX5 физически взаимодействует с Nkx2.5, формируя активационный комплекс Nkx2.5/GATA4/TBX5 [63]; в предшественниках кардиомиоцитов этот комплекс запускает транскрипцию генов рабочего фенотипа. Наоборот, TBX3, замещая TBX5 в комплексе Nkx2.5/GATA4, подавляет транскрипцию генов рабочего фенотипа [38]. Установлено, что Nkx2.5 и Isl1 также функционируют антагонистически и подавляют экспрессию друг друга.

Под контролем Nkx2.5/GATA4 находится ген предсердного натрийуретического пептида Npra. Предсердный натрийуретический пептид экспрессируют только те кардиомиоциты, в которых высок уровень Nkx2.5, в то время как все структуры, являющиеся производными венозного синуса, в том числе САУ, его не экспрессируют. Этот пептид длительное время рассматривался как маркер рабочего предсердного и желудочкового миокарда [64].

Клетки ВС на всем протяжении эмбрионального развития, а также кардиомиоциты дефинитивного САУ экспрессируют гомеодоменный ТФ Shox2. Более того, экспрессия Shox2 ограничена ВС в ходе эмбрионального развития и миокардом САУ у взрослых млекопитающих. Мутанты по гену *Shox2* демонстрируют выраженную гипоплазию САУ, сопровождающуюся тяжелой брадикардией. В межвенной области правого предсердия, соответствующей расположению САУ, у мутантов *Shox2*^{-/-} наблюдается экспрессия Nkx2.5 и коннектинов Cx43, характерных для рабочего миокарда [65]. Shox2 необходим для формирования мезенхимальных предшественников САУ.

Непосредственными мишенями Shox2 являются гены ключевых ТФ, определяющие пейсмекерный фенотип кардиомиоцитов – Isl1, TBX3, TBX18, T,5, BMP4 [66]; Shox2 для Nkx2.5 в миокарде ВС выступает в роли репрессора [67]. Показано, что именно антагонистический баланс физически взаимодействующих Shox2 и Nkx2.5 определяет фенотип кардиомиоцитов и способность миокардиальной ткани к автоматии. Предполагается, что, наряду с TBX3 и TBX18, Shox2 предотвращает атриализацию САУ, но в то же время, активируя «пропейсмекерные гены», обуславливает эктопическую аритмогенную активность в миокарде легочных вен [68, 69]. Таким образом, Shox2 находится на вершине иерархии ТФ, контролирующих «пейсмекерную» (эпи)генетическую программу [70] (рис. 2).

3.2. Миокардиальные морфогены семейства BMP

Костные морфогенетические белки (BMP – bone morphogenic protein) относятся к суперсемейству трансформирующего ростового фактора и регулируют развитие практически всех тканей и органов у животных. Белки этого семейства и их мембранные рецепторы необходимы как для ранних, так и для поздних этапов кардиогенеза. В частности, BMP необходимы для дифференцировки кардиобластов из мезенхимальных предшественников [71]. Роль BMP в эмбриогенезе пейсмекера сердца несомненна. Однако, вследствие многочисленности белков семейства и сложного характера их взаимодействия, только для некоторых представителей этой группы морфогенов установлено их значение для формирования САУ.

BMP2 стимулирует ЭМП, способствуя накоплению пула мезенхимальных кардиогенных кле-

ток, активирует экспрессию репрессоров транскрипции, специфических для пейсмекерного миокарда – TBX2 и TBX3 [45, 72]. BMP2 подавляет экспрессию *Scn5a*, кодирующего ионный канал Nav1.5, характерный для рабочего миокарда [3].

BMP4 является непосредственной мишенью Shox2: этот ТФ взаимодействует с промотором *Bmp4* в ткани венозного конца сердечной трубки [73]. У мутантов *Shox2^{-/-}* экспрессия BMP4 практически полностью подавлена, кроме того, снижена экспрессия HCN4, а экспрессия *Cx40* избыточно распространена в дорзальной мезенхиме [47]. По крайней мере в эмбриональной культуре BMP4 стимулирует дифференцировку TBX18-позитивных предшественников в миоцитоподобные клетки, демонстрирующие способность генерировать пейсмекерные потенциалы действия [74]. С большой вероятностью BMP4 является необходимым морфогенетическим фактором для САУ.

3.3. Сигнальные белки семейства Wnt; Wnt/ β -катениновый и Wnt/JNK-путь в морфогенезе САУ

Класс секретлируемых белков Wnt включает у млекопитающих более 10 членов; белки Wnt участвуют в поддержании свойств стволовых клеток, межклеточной коммуникации, индукции мезодермы и регулируют эмбриогенез целого ряда органов и тканей [75]. Сигнальный путь Wnt включает сопряженные с G-белком мембранные рецепторы семейства Frizzled (Fz-рецепторы) [76]. Сигнализация посредством Wnt находится под тесным контролем множества факторов, таких как ингибиторы передачи Wnt-сигнала, наиболее известным из которых является DKK1 (белок семейства «дикокопф»). Сигнальные каскады Wnt разделяют на два типа: «канонический» и «неканонические». В каноническом сигнальном пути активация Fz-рецептора приводит к стабилизации цитоплазматического белка β -катенина. Накапливающийся в ядре β -катенин связывает и активирует комплекс TCF/LEF, являющийся ТФ для генов-мишеней Wnt [77]. Один из неканонических путей Wnt, вовлеченных в кардиогенез, включает киназу JNK (c-Jun kinase). Киназа JNK активирует белок c-Jun, который совместно с белком c-Fos формирует гетеродимерный ТФ «немедленного ответа» AP-1 (activator protein 1) [7].

Множественность лигандов сигнальных путей Wnt, а также сложность пространственно-временного паттерна экспрессии элементов Wnt затрудняют изучение роли этого важнейшего фактора в морфогенезе структур сердца. Тем не менее установлено, что на ранних стадиях сигнализация как через канонический Wnt/ β -катениновый (Wnt/ β), так и неканонический Wnt/JNK-путь необходима для индукции *Isl1*⁻, *Nkx2.5*-позитивной кардио-генной мезодермы, для поддержания пула и пролиферации кардиогенных клеток- предше-

ственников, а также для предотвращения преждевременной дифференцировки мезенхимальных клеток в кардиомиоциты [78].

После выделения кардиогенных полей Wnt/ β -катениновая сигнализация ограничивает дифференцировку и стимулирует пролиферацию *Nkx2.5*-негативных клеток ВКП. Таким образом, Wnt/ β (возможно, посредством Wnt2 и/или Wnt10a) способствует рекрутингу клеток и развитию венозного полюса сердца (ВС и его рогов), обеспечивает миокардиализацию кардинальных вен [79]. Неканоническая Wnt/JNK-сигнализация, наоборот, стимулирует терминальную дифференцировку клеток, происходящих из всех кардиогенных полей (рис. 3А) [78, 80]. По крайней мере в одной работе показано, что манипуляции, приводящие к подавлению Wnt/ β или Wnt/JNK, не вызывают нарушения формирования TBX18-позитивного пула клеток в ВС и последующего формирования САУ [79]. Эти данные подтверждают предположение, что клетки-предшественники САУ выделяются в кардиогенной мезодерме очень рано, а Wnt действует независимо от TBX18 и участвует лишь в эмбриогенезе «правильного» окружения и необходимых для мигрирующих клеток-предшественников САУ «мест притяжения» (кардинальных вен).

3.4. Белок Wt1

Продукт гена *Wt1* является ТФ, ранее известным как белок, вовлеченный в патогенез нефробластомы Вильмса (*Wt1* – Wilms tumor 1). В настоящее время установлено, что *Wt1* важен для морфогенеза ряда органов, а в кардиогенезе этот ТФ стимулирует рекрутинг мезенхимальных предшественников из кардиогенной мезодермы посредством ЭМП, подавляя экспрессию E-кадгерина. Подавление экспрессии гена E-кадгерина *Cdh1* происходит за счет усиления транскрипции *Snail*, кодирующего репрессор генов белков адгезии [81]. Установлено, что *Wt1* критически важен для нормального развития общих кардинальных вен, их миокардиализации и формирования рогов ВС [82]. *Wt1* необходим для правильной локализации кардинальных вен в каудальной области сердечной трубки (рис. 3А). Интересно, что у *Wt1^{-/-}*-мутантов обнаруживаются клетки-предшественники САУ, однако невозможно формирование дефинитивного САУ.

Предполагается, что эффекты *Wt1* обусловлены локальной стимуляцией экспрессии *Raldh2* – гена ретинальдегиддегидрогеназы 2, синтезирующей ретиноевую кислоту (РК) из ретинальдегида. РК является фактором, стимулирующим дифференцировку кардиомиоцитов [83], а также локальный апоптоз групп мезенхимальных клеток, что способствует правильному позиционированию общих кардинальных вен и формированию субстрата для будущего САУ.

3.5. Сигнальный каскад Slit/Robo

Белки семейства Slit (белки «средней линии») представляют собой секретируемые внеклеточные молекулы, наиболее известной функцией которых является управление ростом аксонов [84]. Белки семейства Robo (рецепторы «кругового перекрестка») являются мембранными рецепторами Slit. У млекопитающих экспрессируется *Robo1-4* [85, 86]. Рецепторы Robo взаимодействуют с цитоплазматическими белками, участвующими в каскадах, регулирующих клеточную адгезию, пролиферацию, модификацию цитоскелета [87].

В настоящее время показано, что лиганды семейства Slit (Slit2, Slit3) и их рецепторы Robo (Robo1, Robo2) экспрессируются в промиокардиальных клетках ВКП в пределах кардиогенного серпа, кардиомиоцитах первичной сердечной трубки, а также в различных отделах сердца на более поздних этапах пренатального онтогенеза [87],

играя, таким образом, существенную роль в кардиогенезе. Мутации в генах элементов сигнального каскада Slit/Robo приводят к различного рода дефектам развития в сердце. В частности, мутации в генах *Robo* ассоциируют с тетрадой Фалло и синдромом Холта-Орама [87, 88].

Поскольку экспрессия *Slit2* обнаруживается в мезенхиме, окружающей полые вены, а экспрессия *Slit3* детектируется в миокарде рогов ВС, предположили, что сигнальный каскад Slit/Robo участвует в формировании ВС и САУ [89]. Кроме того, рецепторы Robo1 и Robo2 экспрессируются в области венозного полюса эмбрионального сердца и мезенхиме заднего отдела ВКП [90]. У мутантов *Robo1^{-/-}*, *Robo2^{-/-}*, не экспрессирующих Robo1 и Robo2, невозможно формирование рогов ВС, что приводит к гипоплазии полых вен (рис. 3Б) [87]. Однако накопление клеток САУ у указанных мутантов не нарушено [89].

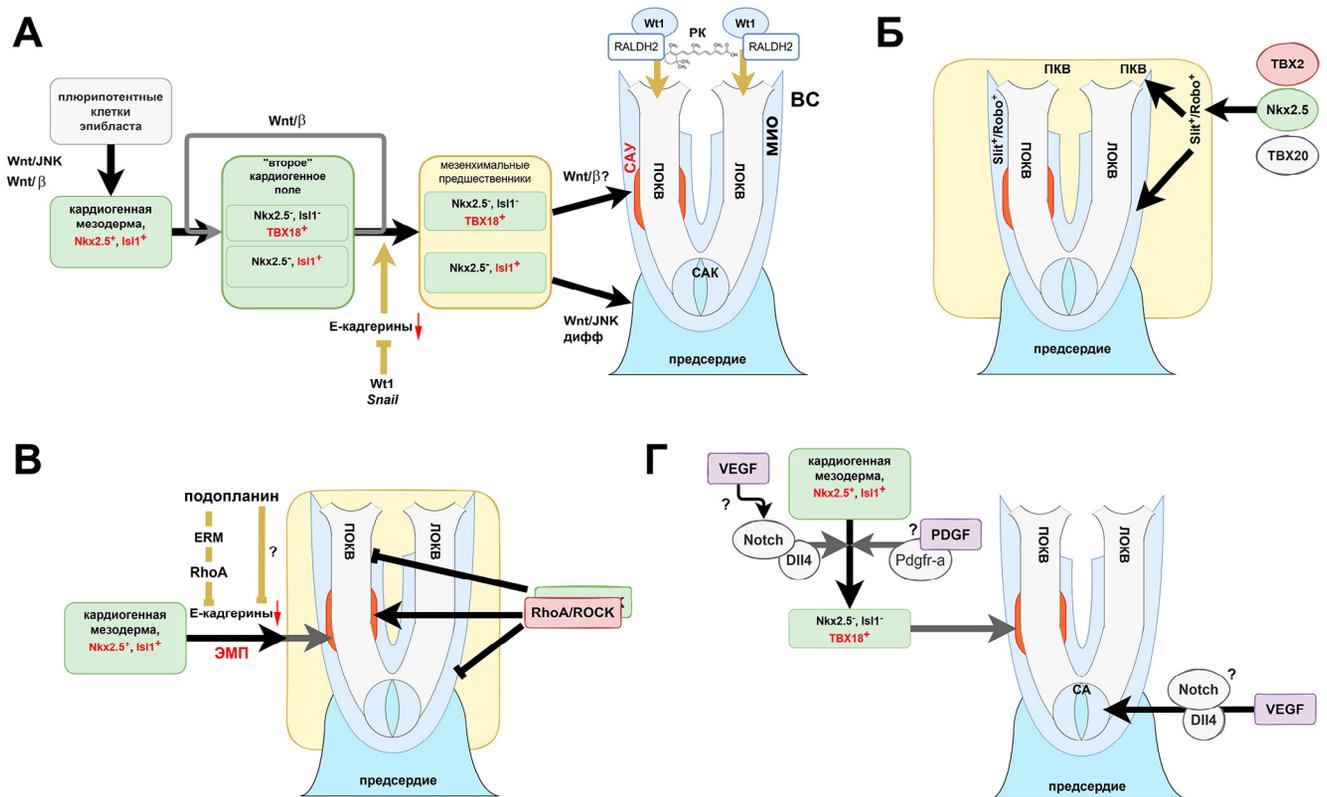


Рис. 3. Сигнальные молекулы и каскады, контролирующие морфогенез доминантного пейсмекера сердца млекопитающих в синоатриальном узле (САУ). **А.** Роль сигнальных каскадов Wnt и Wt1 в индукции, пролиферации и дифференцировке клеток-предшественников САУ. Сигнальный каскад Wt1 необходим для формирования кардинальных вен. **Б.** Сигнальный каскад Slit/Robo в морфогенезе структур венозного синуса и его контроль со стороны транскрипционных факторов. Slit/Robo необходим для формирования морфологической основы в венозном полюсе сердца для мигрирующих клеток-предшественников САУ. **В.** Подопланин и сигнальный каскад, включающий RhoA, а также RhoA-киназу (ROCK) как факторы эмбриогенеза САУ. Подопланин, подавляя экспрессию белков клеточной адгезии и стимулируя эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), способствует накоплению клеток-предшественников, формирующих САУ. Rho/ROCK необходим для примордиального ограничения экспансии клеток-предшественников САУ в венозном синусе. **Г.** Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) и фактор роста тромбоцитов (PDGF) необходимы для индукции мезодермальных и мезенхимальных клеток-предшественников САУ. Красным цветом показана область эмбрионального САУ в венозном синусе; зеленым цветом показаны участки кардиогенной мезодермы; желтым цветом показан пул мезенхимальных клеток второго кардиогенного поля и латерального ободка. ВС – венозный синус, дифф – терминальная дифференцировка, мио – миокардиальная стенка рогов ВС, ПКВ – передняя кардинальная вена, ПОКВ, ЛОКВ – правая или левая общая кардинальная вена, РК – ретиноевая кислота, САК – синоатриальный клапан. Wnt/β – канонический «β-катениновый» сигнальный путь Wnt; Wnt/JNK – неканонический сигнальный путь Wnt, включающий киназу фактора c-Jun; ? – предполагаемый механизм.

Этот факт подтверждает гипотезу о раннем разделении предшественников САУ и миоцитов ВС в эмбриогенезе. Кроме того, у мутантов *Slit3*^{-/-} не происходит миокардиализации краниальных (верхних) полых вен. Таким образом, изменение активности каскада *Slit/Robo* может влиять на аритмогенность миокардиальной обкладки полых вен.

Регуляция активности сигнального каскада *Slit/Robo* тесно связана с ключевыми ТФ кардио-генеза — *TBX2*, *TBX20*, *TBX5*, *Nkx2.5*. ТФ *TBX2* может связываться с промотором гена *Slit3*, ограничивая его экспрессию; *Nkx2.5* также подавляет экспрессию генов *Slit*; в то же время *TBX20*, наоборот, стимулирует экспрессию *Slit*. Предполагается, что ТФ *TBX2*, *20* и *Nkx2.5* сложным образом определяют пространственный паттерн экспрессии *Slit* в развивающемся сердце [87, 90].

3.6. Подопланин

Подопланин является трансмембранным, сильно гликозилированным белком (муциноподобным гликопротеином), играющим важную роль в регуляции морфогенеза [91]. В настоящее время показано, что подопланин является маркером мезенхимальных клеток ВКП и экспрессируется в *Nkx2.5*-негативных, *TBX3*-позитивных предшественниках и кардиомиоцитах ВС и краниальных вен, в клетках-предшественниках и зрелых кардиомиоцитах САУ [37].

Как указано выше, кардиогенная мезенхима заднего кардиогенного поля и латерального ободка формируется за счет рекрутинга клеток висцеральной мезодермы (по сути, целомического эпителия — мезотелия), претерпевающих ЭМП. Для реализации программы ЭМП необходимо подавление экспрессии в мезодерме белков клеточной адгезии, в частности E-кадгерина. Подопланин подавляет экспрессию E-кадгерина, способствуя ЭМП [92], миграции и экспансии мезенхимальных предшественников кардиомиоцитов венозного полюса сердца. Подавление экспрессии подопланина в эмбриональном онтогенезе вызывает гипоплазию САУ [93, 94].

Подопланин активирует сигнальный каскад *RhoA/Rock*, включающий, соответственно, малую ГТФазу семейства *Rho* (*RhoA*) и *Rho*-зависимую киназу (*Rock*). Считается, что с подопланином взаимодействуют белки так называемой ERM-группы (*ezrin*, *radixin*, *moesin*), обуславливающие связь плазматической мембраны с цитоскелетом и определяющие клеточную подвижность [95]. Взаимодействие подопланина с ERM-белками приводит к активации *RhoA*, что способствует ЭМП в мезотелии ВКП. Показано, что активация *RhoA* подавляет экспрессию E-кадгерина и, таким образом, стимулирует ЭМП и накопление клеток-предшественников, а также развитие САУ (рис. 3В) [93].

3.7. Сигнальный каскад малых ГТФаз *RhoA/Rock*

Сигнальный каскад малых ГТФаз *RhoA/Rock* известен как ключевой регулятор динамической реорганизации цитоскелета. Кроме того, *RhoA/Rock* участвует в контроле миграции, пролиферации и дифференцировки клеток в онтогенезе [96].

В настоящее время показано, что *RhoA/Rock* играет важную роль в раннем кардиогенезе и формировании пейсмекера сердца. У эмбрионов курицы экспрессия *RhoA* исходно наблюдается во всей сердечной трубке, но в ходе развития постепенно ограничивается до небольшой группы *Nkx2.5*⁻/*Isl1*⁻/*TBX18*⁺-клеток, т.е. совпадает с зоной локализации предшественников САУ [97]. У млекопитающих подавление сигнализации через *RhoA/Rock*, а также подавление экспрессии *Rock* приводит к снижению уровня ключевых для САУ ТФ — *Isl1*, *TBX3*, *Shox2*. В то же время подавление *RhoA/Rock* вызывает aberrантный паттерн экспрессии ТФ: высокий уровень *Isl1* и *Shox2* наблюдался за пределами правого рога ВС. Кроме того, при экспериментальном нарушении сигнального пути *RhoA/Rock* пейсмекерные потенциалы действия обнаруживаются вне зоны примордиального САУ, а также в левом отделе ВС; наблюдаются аномальный характер активации и паттерн проведения возбуждения в венозном синусе (рис. 3В) [98].

Таким образом, *RhoA/Rock* критически важен для формирования дефинитивного САУ: активность сигнального пути необходима для латерализации, компактизации САУ и, возможно, реализуется путем контроля ключевых для САУ ТФ. Кроме того, *RhoA/Rock* ограничивает экспрессию «пропейсмекерных» генов вне зоны дефинитивного САУ, предотвращая эктопическую аритмогенную активность в предсердном миокарде.

3.8. Эндотелиальный фактор роста сосудов

В ряде работ показано, что избыточная экспрессия у мышей одного из белков (*VEGF*₁₂₀), относящихся к семейству эндотелиальных факторов роста (*VEGF* — vascular endothelial growth factor), приводит к брадикардии и гипоплазии САУ, при которой плотность кардиомиоцитов в пейсмекерной области снижена, а васкуляризация, наоборот, повышена [99, 100]. Кроме того, избыточная экспрессия *VEGF*₁₂₀ приводит к появлению коннексинов высокой проводимости *Sx43* в САУ и его дисфункции [101]. Таким образом, имеется экспериментальное подтверждение участия *VEGF* в формировании САУ.

Одним из сигнальных путей, активируемых *VEGF* посредством его рецепторов *VEGFR2*, является т.н. *Dll4/Notch*-каскад [102]. Трансмембранные белки *Notch* (продукты генов, ассоциированных с мутацией, при которой у плодовых мушек наблюдаются выемки на краях крыльев) совместно с белком *Dll4* («дельта-подобный» бе-

лок 4) являются важнейшими медиаторами межклеточных взаимодействий. Сигнализация через Dll4/Notch регулирует миграцию и пролиферацию клеток в ходе развития. При активации VEGF внутриклеточный домен белка Notch транслоцируется в ядро, где выступает в роли транскрипционного коактиватора. Несмотря на то, что сигнальный путь VEGF/Dll4/Notch считается эндотелиальным (и эндокардиальным), установлено, что этот каскад координирует дифференцировку и пролиферативную активность в ВКП [101]. На поздних этапах кардиогенеза VEGF/Dll4/Notch регулирует трабекуляризацию миокарда, развитие клапанов сердца и коронарных артерий [103].

К настоящему моменту показано, что Notch1 критически важен для нормального развития САК, спецификации клеток-предшественников и формирования САУ. Подавление экспрессии Notch1 в эндокарде останавливает развитие САК, снижает количество клеток, экспрессирующих HCN4 и TBX18, и приводит к гипоплазии САУ. Показано, что Notch1 необходим для индукции и рекрутинга мезенхимальных TBX18-позитивных предшественников САУ, а также пролиферации этого клеточного клона (рис. 3Г). Предполагается, что медиатором «эндокардиального» фактора Notch1 в миокардиальной мезенхиме является нейрегулин, активирующий канонический Wnt/ β -катениновый путь [104].

3.9. Фактор роста тромбоцитов

Как и в случае с VEGF, наиболее известной ролью тромбоцитарного фактора роста (PDGF – platelet-derived growth factor) является стимуляция ангиогенеза. Эффекты PDGF реализуются посредством активации мембранных рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью. Показано, что PDGF и его рецептор Pdgfr- α необходимы для спецификации прокардиогенных клеток задней части ВКП – т.е. той области мезодермы, в которой предполагается локализация клеток-предшественников САУ [105]. Имеются противоречивые данные касательно роли PDGF/Pdgfr- α в позднем кардиогенезе и формировании САУ. Согласно результатам ранних исследований, подавление экспрессии Pdgfr- α приводит к гипоплазии ВС и САУ. У мышей, мутантов *Pdgfra*^{-/-}, в различных участках развивающегося сердца, включая кардинальные вены и САУ, повышается уровень Nkx2.5 и Wt1 [106]. Однако, согласно более поздним исследованиям, у мутантов *Pdgfra*^{-/-} не наблюдалось каких-либо морфологических либо функциональных изменений САУ [107]. Возможно, что рецептор Pdgfr- α необходим для накопления пула мезенхимальных клеток-предшественников САУ в кардиогенной мезодерме и контроля их миграции на самых ранних этапах онтогенеза (рис. 3Г).

Проведенный недавно анализ транскриптома фетальных клеток и кардиомиоцитов зрелого САУ с помощью РНК-секвенирования показал, что в пейсмекерных клетках по сравнению с кардиомиоцитами рабочего миокарда существенно повышена экспрессия более 2000 генов, включая гены ТФ, ионных каналов и белков кальциевого круговорота.

В клетках САУ существенно выше экспрессия *Notch* и функционально ассоциированных с ним генов; генов, связанных с сигнальным каскадом BMP; генов, ассоциированных с организацией и ремоделированием внеклеточного матрикса, межклеточных контактов. Эти данные косвенно подтверждают участие ряда вышеописанных регуляторных каскадов в формировании пейсмекера сердца у млекопитающих. Показано также, что экспрессия ключевых генов *TBX3*, *Isl1*, *Shox2*, *Hcn4*, генов BMP-сигнализации остается высокой не только в эмбриональном периоде онтогенеза, но и кардиомиоцитах дефинитивного САУ, поддерживая уникальный электрофизиологический фенотип пейсмекерных клеток.

Таким образом, к настоящему времени установлены основные молекулярные регуляторы, необходимые для формирования САУ. К наиболее важным факторам следует, в первую очередь, отнести те, что индуцируют кардиогенную мезодерму и ЭМП, способствуя накоплению пула мезенхимальных клеток-предшественников САУ (BMP, Wnt, VEGF), а также стимулируют их миграцию (подопланин). Во вторую очередь к необходимым факторам следует отнести те, что способствуют формированию пейсмекерного электрофизиологического фенотипа в клетках-предшественниках САУ – это TBX3, TBX18, Isl1 и, вероятно, наиболее значимый среди ТФ – Shox2.

Установление молекулярных факторов, направляющих «судьбу» клеток-предшественников по пути формирования пейсмекерных кардиомиоцитов, привело к некоторому прогрессу в проблеме создания искусственных биологических пейсмекеров. Как указано выше, повышение экспрессии пропейсмекерных ТФ в рабочих зрелых кардиомиоцитах или в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (ИПСК) способно их репрограммировать в «пейсмекероподобные» клетки [55, 108, 109]. Следует указать, что до недавнего времени основной подход к индукции автоматической активности в кардиомиоцитах заключался в трансдукции клеток или миокардиальной ткани векторными конструкциями, приводящими к подавлению экспрессии калиевых ионных каналов аномального выпрямления (Kir2.x) либо к усилению экспрессии каналов HCN, ответственных за пейсмекерный ток I_f. Как подтверждено в ряде работ, при таком подходе кардиомиоциты действительно приобретают способность спонтанно генерировать потенциалы

действия, однако они не приобретают фенотип клеток САУ.

Упомянутый прогресс, в значительной степени, сводится к уточнению состава коктейлей регуляторных факторов (ингибиторов или активаторов рецепторов), используемых для направления дифференцировки ИПСК, эмбриональных стволовых клеток или эмбриональных кардиомиоцитов в пейсмекерные клетки. Современные протоколы, в которых, в том числе, применяются ингибиторы сигнальных каскадов Wnt, сигнальных каскадов BMP, RhoA/ROCK, позволяют получить заметный процент САУ-подобных клеток в популяции кардиомиоцитов при дифференцировке ИПСК [110]. Такие САУ-подобные клетки демонстрируют способность к автоматии, пейсмекерные потенциалы действия, могут быть Nkx2-5-негативными, а также экспрессировать Isl1, TBX3, TBX18, Shox2, HNC4 и Cx45. Тем не менее, популяции САУ-подобных клеток, получаемых из ИПСК, крайне гетерогенны как по электрофизиологическим свойствам, так по и профилю экспрессии белков, что затрудняет их использование при клеточной терапии.

Тем не менее, биоинженерный подход к созданию биологических «пейсмекероподобных» органоидов, а также способы восстановления ритма сердца на основе клеточной терапии или локальном контроле экспрессии генов широко обсуждается в литературе [111]. Предполагается, что перспективным методом получения САУ-подобных клеток из ИПСК является поэтапная манипуляция экспрессией ТФ, направляющих развитие и дифференцировку по пейсмекерному пути. Показано, что контролируемая во времени стимуляция факторами BMP4, FGF, активином А с последующей обработкой ингибиторами продукции Wnt и VEGF приводит к почти полной дифферен-

цировке ИПСК в САУ-подобные клетки, экспрессирующие Isl1, TBX3, TBX18, Shox2, HNC4, Cx45 [112]. Экспериментально показано, что такие САУ-подобные клетки способны при трансплантации в рабочий миокард желудочков задавать ритм, формируя таким образом искусственный биологический пейсмекер.

Наряду с вышесказанным, считается перспективной трансдифференцировка соматических клеток, таких как фибробласты или зрелые рабочие кардиомиоциты, в САУ-подобные клетки [111, 113]. В ряде работ показано, что индукция экспрессии в соматических клетках одного или нескольких пропейсмекерных ТФ – TBX3 [55], TBX18 [114], Isl1 [115] – приводит к их репрограммированию в кардиомиоциты, демонстрирующие, в большей или меньшей степени, фенотип клеток САУ и способность поддерживать ритм после трансплантации в рабочий миокард.

В заключение следует указать, что транскриптомное профилирование выявило значительное количество новых специфических для САУ факторов, участие которых в развитии пейсмекера сердца ранее известно не было [3, 116]. В итоге многогранная и сложная регуляция развития пейсмекера сердца позвоночных животных, несмотря на значительный прогресс в понимании морфогенеза, локализации ключевой клеточной популяции и идентификации ключевых ТФ, все еще требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-14-50459. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы декларируют отсутствие каких-либо конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Souza D.S., Barreto T. de O., Santana M.N.S., Menezes-Filho J.E., Cruz J.S., Vasconcelos C.M. Resident macrophages orchestrating heart rate // *Arq. Bras. Cardiol.* 2019. Vol. 112. N 5. P. 588–591.
2. Faber J.W., Boukens B.J., Oostra R.J., Moorman A.F., Christoffels V.M., Jensen B. Sinus venosus incorporation: contentious issues and operational criteria for developmental and evolutionary studies // *J. Anat.* 2019. Vol. 234. N 5. P. 583–591.
3. van Eijf V.W.W., Stefanovic S., van Duijvenboden K., Bakker M., Wakker V, de Gier-de Vries C., Zaffran S., Verkerk A.O., Boukens B.J., Christoffels V.M. Transcriptome analysis of mouse and human sinoatrial node cells reveals a conserved genetic program // *Dev.* 2019. Vol. 146. N 8: dev173161.
4. Sizarov A., Devalla H.D., Anderson R.H., Passier R., Christoffels V.M., Moorman A.F. Molecular analysis of patterning of conduction tissues in the developing human heart // *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* 2011. Vol. 4. N 4. P. 532–542.
5. Burdsal C.A., Damsky C.H., Pedersen R.A. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak // *Dev.* 1993. Vol. 118. N 3. P. 829–844.
6. Cai W., Guzzo R.M., Wei K., Willems E., Davidovics H., Mercola M. A Nodal-to-TGFβ cascade exerts biphasic control over cardiopoiesis // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111. N 7. P. 876–881.
7. Mazzotta S., Neves C., Bonner R.J., Bernardo A.S., Docherty K., Hoppler S. Distinctive roles of canonical and noncanonical Wnt signaling in human embryonic cardiomyocyte development // *Stem cell reports.* 2016. Vol. 7. N 4. P. 764–776.
8. Steinhart Z., Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis // *Dev.* 2018. Vol. 145. N 11: dev146589.

9. Zaffran S., Frasch M. Early signals in cardiac development // *Circ. Res.* 2002. Vol. 91. N 6. P. 457–469.
10. Ciruna B., Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak // *Dev. Cell.* 2001. Vol. 1. N 1. P. 37–49.
11. Moorman A.F.M., Christoffels V.M., Anderson R.H., van den Hoff M.J. The heart-forming fields: One or multiple? // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2007. Vol. 362. N 1484. P. 1257–1265.
12. Stalsberg H., DeHaan R.L. The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo // *Dev. Biol.* 1969. Vol. 19. N 2. P. 128–159.
13. Tyser R.C., Miranda A.M., Chen C.-M., Davidson S.M., Srinivas S., Riley P.R. Calcium handling precedes cardiac differentiation to initiate the first heartbeat // *Elife.* 2016. Vol. 5: e17113.
14. Patten B.M. Initiation and early changes in the character of the heart beat in vertebrate embryos // *Physiol. Rev.* 1949. Vol. 29. N 1. P. 31–47.
15. Forouhar A.S., Liebling M., Hickerson A., Nasiraei-Moghaddam A., Tsai H.J., Hove J.R., Fraser S.E., Dickinson M.E., Gharib M. The embryonic vertebrate heart tube is a dynamic suction pump // *Science.* 2006. Vol. 312. N 5774. P. 751–753.
16. Van Mierop L.H. Location of pacemaker in chick embryo heart at the time of initiation of heartbeat // *Am. J. Physiol.* 1967. Vol. 212. N 2. P. 407–415.
17. Groot A.C.G., Bartelings M.M., Poelmann R.E., Haak M.C., Jongbloed M.R. Embryology of the heart and its impact on understanding fetal and neonatal heart disease // *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2013. Vol. 18. N 5. P. 237–244.
18. Später D., Abramczuk M.K., Buac K., Zangi L., Stachel M.W., Clarke J., Sahara M., Ludwig A., Chien K.R. A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells // *Nat. Cell Biol.* 2013. Vol. 15. N 9. P. 1098–1106.
19. Garcia-Frigola C., Shi Y., Evans S.M. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development // *Gene Expr. Patterns.* 2003. Vol. 3. N 6. P. 777–783.
20. Christoffels V.M., Mommersteeg M.T.M., Trowe M.-O., Prall O.W., de Gier-de Vries C., Soufan A.T., Bussen M., Schuster-Gossler K., Harvey R.P., Moorman A.F., Kispert A. Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18 // *Circ. Res.* 2006. Vol. 98. N 12. P. 1555–1563.
21. DiFrancesco D. The role of the funny current in pacemaker activity // *Circ. Res.* 2010. Vol. 106. N 3. P. 434–446.
22. Aminu A.J., Petkova M., Atkinson A.J., Yanni J., Morris A.D., Simms R.T., Chen W., Yin Z., Kuniewicz M., Holda M.K., Kuzmin V.S. Further insights into the molecular complexity of the human sinus node – the role of “novel” transcription factors and microRNAs // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2021. Vol. 15: S0079-6107(21)00038-9.
23. Jensen B., Vesterskov S., Boukens B.J., Nielsen J.M., Moorman A.F., Christoffels V.M., Wang T. Morpho-functional characterization of the systemic venous pole of the reptile heart // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. N 1: 6644.
24. Mommersteeg M.T.M., Hoogaars W.M.H., Prall O.W.J., de Gier-de Vries C., Wiese C., Clout D.E., Papaioannou V.E., Brown N.A., Harvey R.P., Moorman A.F., Christoffels V.M. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node // *Circ. Res.* 2007. Vol. 100. N 3. P. 354–362.
25. Sylva M., Hoff M.J.B. Van Den, Moorman A.F.M. Development of the human heart // *Am. J. Med. Genet. A.* 2014. Vol. 164A. N 6. P. 1347–1371.
26. Zhou B., Ma Q., Rajagopal S., Domian I., Rivera-Feliciano J., Jiang D., von Gise A., Ikeda S., Chien K.R., Pu W.T. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart // *Nature.* 2008. Vol. 454. N 7200. P. 109–113.
27. Moorman A.F.M., Christoffels V.M. Cardiac chamber formation: Development, genes, and evolution // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83. N 4. P. 1223–1267.
28. Buckingham M., Meilhac S., Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells // *Nat. Rev. Genet.* 2005. Vol. 6. N 11. P. 826–835.
29. Cai C.-L., Liang X., Shi Y., Chu P.H., Pfaff S.L., Chen J., Evans S. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart // *Dev. Cell.* 2003. Vol. 5. N 6. P. 877–889.
30. Snarr B.S., O’Neal J.L., Chintalapudi M.R., Wirrig E.E., Phelps A.L., Kubalak S.W., Wessels A. Isl1 expression at the venous pole identifies a novel role for the second heart field in cardiac development // *Circ. Res.* 2007. Vol. 101. N 10. P. 971–974.
31. Galli D., Domínguez J.N., Zaffran S., Munk A., Brown N.A., Buckingham M.E. Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed // *Dev.* 2008. Vol. 135. N 6. P. 1157–1167.
32. Douglas Y.L., Jongbloed M.R.M., Deruiter M.C., Gittenberger-de Groot A.C. Normal and abnormal development of pulmonary veins: state of the art and correlation with clinical entities // *Int. J. Cardiol.* 2011. Vol. 147. N 1. P. 13–24.
33. Kelly R.G., Brown N.A., Buckingham M.E. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm // *Dev. Cell.* 2001. Vol. 1. N 3. P. 435–440.
34. Van Den Berg G., Abu-Issa R., De Boer B.A., Hutson M.R., de Boer P.A., Soufan A.T., Ruijter J.M., Kirby M.L., van den Hoff M.J., Moorman A.F. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube // *Circ. Res.* 2009. Vol. 104. N 2. P. 179–188.
35. Mommersteeg M.T.M., Domínguez J.N., Wiese C., Norden J., De Gier-De Vries C., Burch J.B., Kispert A., Brown N.A., Moorman A.F., Christoffels V.M. The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development // *Cardiovasc. Res.* 2010. Vol. 87. N 1. P. 92–101.
36. Bondue A., Blanpain C. Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment // *Circ. res.* 2010. Vol. 107. N 12. P. 575–578.
37. Groot A.C.G., Mahtab E.A.F., Hahurij N.D., Wisse L.J., Deruiter M.C., Wijffels M.C., Poelmann R.E. Nkx2-5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system // *Anat. Rec.* 2007. Vol. 290. N 1. P. 115–122.
38. Stefanovic S., Christoffels V.M. GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage

- specification and differentiation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72. N 20. P. 3871–3881.
39. Ma Q., Zhou B., Pu W.T. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity // *Dev. Biol.* 2008. Vol. 323. N 1. P. 98–104.
40. Wiese C., Grieskamp T., Airik R., Mommersteeg M.T., Gardiwal A., de Gier-de Vries C., Schuster-Gossler K., Moorman A.F., Kispert A., Christoffels V.M. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3 // *Circ. Res.* 2009. Vol. 104. N 3. P. 388–397.
41. Sizarov A., Anderson R.H., Christoffels V.M., Moorman A.F. Three-dimensional and molecular analysis of the venous pole of the developing human heart // *Circulation.* 2010. Vol. 122. N 8. P. 798–807.
42. Anderson R.H., Brown N.A., Moorman A.F.M. Development and structures of the venous pole of the heart // *Dev. Dyn.* 2006. Vol. 235. N 1. P. 2–9.
43. Кузьмин В.С., Алексеева Н.В., Розенинтраух Л.В. Миокардиальная ткань торакальных вен позвоночных животных: происхождение и контроль биоэлектрических свойств // *Усп. физиол. наук.* 2017. Т. 48. №3. С. 3–28.
44. Wessels A., Sedmera D. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man // *Physiol. Genomics.* 2003. Vol. 15. N 3. P. 165–176.
45. Singh R., Hoogaars W.M., Barnett P., Grieskamp T., Rana M.S., Buermans H., Farin H.F., Petry M., Heallen T., Martin J.F., Moorman A.F. Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2012. Vol. 69. N 8. P. 1377–1389.
46. Liang X., Wang G., Lin L., Lowe J., Zhang Q., Bu L., Chen Y., Chen J., Sun Y., Evans S.M. HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors // *Circ. Res.* 2013. Vol. 113. N 4. P. 399–407.
47. Sun C., Yu D., Ye W., Liu C., Gu S., Sinsheimer N.R., Song Z., Li X., Chen C., Song Y., Wang S. The short stature homeobox 2 (Shox2)-bone morphogenetic protein (BMP) pathway regulates dorsal mesenchymal protrusion development and its temporary function as a pacemaker during cardiogenesis // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290. N 4. P. 2007–2023.
48. Ivanova A.D., Samoiloва D. V., Razumov A.A., Kuzmin V.S. Rat caval vein myocardium undergoes changes in conduction characteristics during postnatal ontogenesis // *Pflugers Arch.* 2019. Vol. 471. N 11–12. P. 1493–1503.
49. Van Mierop L.H., Gessner I.H. The morphologic development of the sinoatrial node in the mouse // *Am. J. Cardiol.* 1970. Vol. 25. N 2. P. 204–212.
50. Kuzmin V.S., Ivanova A.D., Potekhina V.M., Samoiloва D.V., Ushenin K.S., Shvetsova A.A., Petrov A.M. The susceptibility of the rat pulmonary and caval vein myocardium to the catecholamine-induced ectopy changes oppositely in postnatal development // *J. Physiol.* 2021. Vol. 599. N 11. P. 2803–2821.
51. Hoogaars W.M.H., Engel A., Brons J.F., Verkerk A.O., de Lange F.J., Wong L.E., Bakker M.L., Clout D.E., Wakker V., Barnett P., Ravesloot J.H. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria // *Genes Dev.* 2007. Vol. 21. N 9. P. 1098–1112.
52. Hoogaars W.M.H., Tessari A., Moorman A.F.M., de Boer P.A., Hagoort J., Soufan A.T., Campione M., Christoffels V.M. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart // *Cardiovasc. Res.* 2004. Vol. 62. N 3. P. 489–499.
53. Frank D.U., Carter K.L., Thomas K.R., Burr R.M., Bakker M.L., Coetzee W.A., Tristani-Firouzi M., Bamshad M.J., Christoffels V.M., Moon A.M. Lethal arrhythmias in Tbx3-deficient mice reveal extreme dosage sensitivity of cardiac conduction system function and homeostasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Vol. 109. N 3. P. E154–E163.
54. Mohan R.A., Mommersteeg M.T.M., Domínguez J.N., Choquet C., Wakker V., de Gier-de Vries C., Boink G.J., Boukens B.J., Miquerol L., Verkerk A.O., Christoffels V.M. Embryonic Tbx3⁺ cardiomyocytes form the mature cardiac conduction system by progressive fate restriction // *Dev.* 2018. Vol. 145. N 17: dev167361.
55. Bakker M.L., Boink G.J.J., Boukens B.J., Verkerk A.O., van den Boogaard M., den Haan A.D., Hoogaars W.M., Buermans H.P., de Bakker J.M., Seppen J., Tan H.L. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells // *Cardiovasc. Res.* 2012. Vol. 94. N 3. P. 439–449.
56. Wu M., Peng S., Yang J., Tu Z., Cai X., Cai C.L., Wang Z., Zhao Y. Baf250a orchestrates an epigenetic pathway to repress the Nkx2.5-directed contractile cardiomyocyte program in the sinoatrial node // *Cell Res.* 2014. Vol. 24. N 10. P. 1201–1213.
57. Christoffels V.M., Hoogaars W.M.H., Tessari A., Clout D.E., Moorman A.F., Campione M. T-Box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers // *Dev. Dyn.* 2004. Vol. 229. N 4. P. 763–770.
58. Ivanova A.D., Filatova T.S., Abramochkin D.V., Atkinson A., Dobrzynski H., Kokaeva Z.G., Merzlyak E.M., Pustovit K.B., Kuzmin V.S. Attenuation of inward rectifier potassium current contributes to the α 1-adrenergic receptor-induced proarrhythmicity in the caval vein myocardium // *Acta Physiol. (Oxf).* 2021. Vol. 231. N 4: e13597.
59. Domínguez J.N., Meilhac S.M., Bland Y.S., Buckingham M.E., Brown N.A. Asymmetric fate of the posterior part of the second heart field results in unexpected left/right contributions to both poles of the heart // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111. N 10. P. 1323–1335.
60. Franco D., Campione M. The role of Pitx2 during cardiac development. Linking left-right signaling and congenital heart diseases // *Trends Cardiovasc. Med.* 2003. Vol. 13. N 4. P. 157–163.
61. Wang J., Klysiak E., Sood S., Johnson R.L., Wehrens X.H., Martin J.F. Pitx2 prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Vol. 107. N 21. P. 9753–9758.
62. Durocher D., Dé F., Charron R., Schwartz R.J., Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors have been shown to alter transcription of target genes via binding to the consensus WGATAR sequence through a DNA-binding domain consisting of two adjacent zinc // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 18. P. 5687–5696.
63. Garg V., Kathiriya I.S., Barnes R., Schluterman M.K., King I.N., Butler C.A., Rothrock C.R., Eapen R.S., Hirayama-Yamada K., Joo K., Matsuoka R. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5 // *Nature.* 2003. Vol. 424. N 6947. P. 443–447.

64. Habets P.E.M.H., Moorman A.F.M., Clout D.E.W., van Roon M.A., Lingbeek M., van Lohuizen M., Campione M., Christoffels V.M. Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implications for cardiac chamber formation // *Genes Dev.* 2002. Vol. 16. N 10. P. 1234–1246.
65. Blaschke R.J., Hahurij N.D., Kuijper S., Just S., Wisse L.J., Deissler K., Maxelon T., Anastassiadis K., Spitzer J., Hardt S.E., Schöler H. Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development // *Circulation.* 2007. Vol. 115. N 14. P. 1830–1838.
66. Hoffmann S., Berger I.M., Glaser A., Bacon C., Li L., Gretz N., Steinbeisser H., Rottbauer W., Just S., Rappold G. Islet1 is a direct transcriptional target of the homeodomain transcription factor Shox2 and rescues the Shox2-mediated bradycardia // *Basic Res. Cardiol.* 2013. Vol. 108. N 2: 339.
67. van Eif V.W.W., Devalla H.D., Boink G.J.J., Christoffels V.M. Transcriptional regulation of the cardiac conduction system // *Nat. Rev. Cardiol.* 2018. Vol. 15. N 10. P. 617–630.
68. Ye W., Wang J., Song Y., Yu D., Sun C., Liu C., Chen F., Zhang Y., Wang F., Harvey R.P., Schrader L. A common Shox2-Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node // *Dev.* 2015. Vol. 142. N 14. P. 2521–2532.
69. Potekhina V.M., Averina O.A., Razumov A.A., Kuzmin V.S., Rozenshtaukh L.V. The local repolarization heterogeneity in the murine pulmonary veins myocardium contributes to the spatial distribution of the adrenergically induced ectopic foci // *J. Physiol. Sci.* 2019. Vol. 69. N 6. P. 1041–1055.
70. Espinoza-lewis R.A., Yu L., He F., Liu H., Tang R., Shi J., Sun X., Martin J.F., Wang D., Yang J., Chen Y. Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5 // *Dev. Biol.* 2009. Vol. 327. N 2. P. 376–385.
71. van Wijk B., Moorman A.F.M., van den Hoff M.J.B. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation // *Cardiovasc. Res.* 2007. Vol. 74. N 2. P. 244–255.
72. Ma L., Lu M.-F., Schwartz R.J., Martin J.F. Bmp2 is essential for cardiac cushion epithelial-mesenchymal transition and myocardial patterning // *Dev.* 2005. Vol. 132. N 24. P. 5601–5611.
73. Puskaric S., Schmitteckert S., Mori A.D., Glaser A., Schneider K.U., Bruneau B.G., Blaschke R.J., Steinbeisser H., Rappold G. Shox2 mediates Tbx5 activity by regulating Bmp4 in the pacemaker region of the developing heart // *Hum. Mol. Genet.* 2010. Vol. 19. N 23. P. 4625–4633.
74. Wu L., Du J., Jing X., Yan Y., Deng S., Hao Z., She Q. Bone morphogenetic protein 4 promotes the differentiation of Tbx18-positive epicardial progenitor cells to pacemaker-like cells // *Exp. Ther. Med.* 2019. Vol. 17. N 4. P. 2648–2656.
75. Willert K., Nusse R. Wnt proteins // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. Vol. 4. N 9: a007864.
76. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development // *Cell Res.* 2005. Vol. 15. N 1. P. 28–32.
77. Valenta T., Hausmann G., Basler K. The many faces and functions of β -catenin // *EMBO J.* 2012. Vol. 31. N 12. P. 2714–2736.
78. Hoppler S., Mazzotta S., Kühl M. Wnt Signaling in heart organogenesis // *Wnt signaling in development and disease: Molecular mechanisms and biological functions* / Eds. S. Hoppler and R.T. Moon. John Wiley & Sons, 2014. P. 293–301.
79. Norden J., Greulich F., Rudat C., Taketo M.M., Kispert A. Wnt/ β -catenin signaling maintains the mesenchymal precursor pool for murine sinus horn formation // *Circ. Res.* 2011. Vol. 109. N 6. P. 42–50.
80. Cohen E.D., Miller M.F., Wang Z., Moon R.T., Morrisey E.E. Wnt5a and wnt11 are essential for second heart field progenitor development // *Dev.* 2012. Vol. 139. N 11. P. 1931–1940.
81. Martínez-Estrada O.M., Lettice L.A., Essafi A., Guadix J.A., Slight J., Vecelela V., Hall E., Reichmann J., Devenney P.S., Hohenstein P., Hosen N. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin // *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42. N 1. P. 89–93.
82. Norden J., Grieskamp T., Lausch E., van Wijk B., van den Hoff M.J., Englert C., Petry M., Mommersteeg M.T., Christoffels V.M., Niederreither K., Kispert A. Wt1 and retinoic acid signaling in the subcoelomic mesenchyme control the development of the pleuropericardial membranes and the sinus horns // *Circ. Res.* 2010. Vol. 106. N 7. P. 1212–1220.
83. Niederreither K., Vermot J., Messaddeq N., Schuhbauer B., Chambon P., Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse // *Dev.* 2001. Vol. 128. N 7. P. 1019–1031.
84. Kidd T., Bland K.S., Goodman C.S. Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila* // *Cell.* 1999. Vol. 96. N 6. P. 785–794.
85. Jones C.A., London N.R., Chen H., Park K.W., Sauvaget D., Stockton R.A., Wythe J.D., Suh W., Larrieu-Lahargue F., Mukoyama Y.S., Lindblom P. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. N 4. P. 448–453.
86. Ypsilanti A.R., Zagar Y., Chédotal A. Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo // *Dev.* 2010. Vol. 137. N 12. P. 1939–1952.
87. Zhao J., Mommersteeg M.T.M. Slit-Robo signalling in heart development // *Cardiovasc. Res.* 2018. Vol. 114. N 6. P. 794–804.
88. Kruszka P., Tanpaiboon P., Neas K., Crosby K., Berger S.I., Martinez A.F., Addissie Y.A., Pongprot Y., Sittiwangkul R., Silvilairat S., Makonkawkeyoon K. Loss of function in ROBO1 is associated with tetralogy of Fallot and septal defects // *J. Med. Genet.* 2017. Vol. 54. N 12. P. 825–829.
89. Mommersteeg M.T.M., Andrews W.D., Ypsilanti A.R., Zelina P., Yeh M.L., Norden J., Kispert A., Chédotal A., Christoffels V.M., Parnavelas J.G. Slit-roundabout signaling regulates the development of the cardiac systemic venous return and pericardium // *Circ. Res.* 2013. Vol. 112. N 3. P. 465–475.
90. Medioni C., Bertrand N., Mesbah K., Hudry B., Dupays L., Wolstein O., Washkowitz A.J., Papaioannou V.E., Mohun T.J., Harvey R.P., Zaffran S. Expression of Slit and Robo genes in the developing mouse heart // *Dev. Dyn.* 2010. Vol. 239. N 12. P. 3303–3311.
91. Astarita J., Acton S., Turley S. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer // *Front. Immunol.* 2012. Vol. 3: 283.

92. Quintanilla M., Montero-Montero L., Renart J., Martín-Villar E. Podoplanin in inflammation and cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. N 707: ijms20030707.
93. Mahtab E.A.F., Vicente-Steijn R., Hahurij N.D., Jongbloed M.R., Wisse L.J., DeRuiter M.C., Uhrin P., Zaujec J., Binder B.R., Schalij M.J., Poelmann R.E. Podoplanin deficient mice show a RhoA-related hypoplasia of the sinus venosus myocardium including the sinoatrial node // *Dev. Dyn.* 2009. Vol. 238. N 1. P. 183–193.
94. Mahtab E.A.F., Wijffels M.C.E.F., Van Den Akker N.M.S., Hahurij N.D., Lie-Venema H., Wisse L.J., DeRuiter M.C., Uhrin P., Zaujec J., Binder B.R., Schalij M.J. Cardiac malformations and myocardial abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: correlation with abnormal epicardial development // *Dev. Dyn.* 2008. Vol. 237. N 3. P. 847–857.
95. Martín-Villar E., Megías D., Castel S., Yurrita M.M., Vilaró S., Quintanilla M. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition // *J. Cell Sci.* 2006. Vol. 119. N 21. P. 4541–4553.
96. Amin E., Dubey B.N., Zhang S.-C., Gremer L., Dvorsky R., Moll J.M., Taha M.S., Nagel-Steger L., Piekorz R.P., Somlyo A.V., Ahmadian M.R. Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition // *Biol. Chem.* 2013. Vol. 394. N 11. P. 1399–1410.
97. Vicente-Steijn R., S M., Kolditz D.P., Askar S.F., Bax N.A., Van Der Graaf L.M., Wisse L.J., Passier R., Pijnappels D.A., Schalij M.J., Poelmann R.E. Electrical activation of sinus venosus myocardium and expression patterns of RhoA and Isl-1 in the chick embryo // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2010. Vol. 21. N 11. P. 1284–1292.
98. Vicente-Steijn R., Kelder T.P., Tertoolen L.G., Wisse L.J., Pijnappels D.A., Poelmann R.E., Schalij M.J., deRuiter M.C., Gittenberger-de Groot A.C., Jongbloed M.R. RHOA-ROCK signalling is necessary for lateralization and differentiation of the developing sinoatrial node // *Cardiovasc. Res.* 2017. Vol. 113. N 10. P. 1186–1197.
99. Carmeliet P., Ng Y.S., Nuyens D., Theilmeier G., Brusselmans K., Cornelissen I., Ehler E., Kakkar V.V., Stalmans I., Mattot V., Perriard J.C. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188 // *Nat. Med.* 1999. Vol. 5. N 5. P. 495–502.
100. van den Akker N.M.S., Caolo V., Molin D.G.M. Cellular decisions in cardiac outflow tract and coronary development: an act by VEGF and NOTCH // *Differentiation.* 2012. Vol. 84. N 1. P. 62–78.
101. Calkoen E.E., Vicente-Steijn R., Hahurij N.D., van Munsteren C.J., Roest A.A., DeRuiter M.C., Steendijk P., Schalij M.J., Gittenberger-de Groot A.C., Blom N.A., Jongbloed M.R. Abnormal sinoatrial node development resulting from disturbed vascular endothelial growth factor signaling // *Int. J. Cardiol.* 2015. Vol. 183. P. 249–257.
102. Hellström M., Phng L.-K., Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting // *Cell Adh. Migr.* 2007. Vol. 1. N 3. P. 133–136.
103. Wang Y., Wu B., Lu P., Zhang D., Wu B., Varshney S., del Monte-Nieto G., Zhuang Z., Charafeddine R., Kramer A.H., Sibinga N.E. Uncontrolled angiogenic precursor expansion causes coronary artery anomalies in mice lacking Pofut1 // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. N 1: 578.
104. Wang Y., Lu P., Jiang L., Wu B., Zhou B. Control of sinus venosus valve and sinoatrial node development by endocardial NOTCH1 // *Cardiovasc. Res.* 2020. Vol. 116. N 8. P. 1473–1486.
105. Van Den Akker N.M.S., Lie-Venema H., Maas S., Eralp I., DeRuiter M.C., Poelmann R.E., Gittenberger-De Groot A.C. Platelet-derived growth factors in the developing avian heart and maturing coronary vasculature // *Dev. Dyn.* 2005. Vol. 233. N 4. P. 1579–1588.
106. Bax N.A.M., Bleyl S.B., Gallini R., Wisse L.J., Hunter J., Van Oorschot A.A., Mahtab E.A., Lie-Venema H., Goumans M.J., Betsholtz C., Gittenberger-de Groot A.C. Cardiac malformations in Pdgfra mutant embryos are associated with increased expression of WT1 and Nkx2.5 in the second heart field // *Dev. Dyn.* 2010. Vol. 239. N 8. P. 2307–2317.
107. Zheng X., Wang F., Hu X., Li H., Guan Z., Zhang Y., Hu X. PDGFR α -signaling is dispensable for the development of the sinoatrial node after its fate commitment // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9: 647165.
108. Zhao H., Wang F., Zhang W., Yang M., Tang Y., Wang X., Zhao Q., Huang C. Overexpression of TBX3 in human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) increases their differentiation into cardiac pacemaker-like cells // *Biomed. Pharmacother.* 2020. Vol. 130: 110612.
109. Gorabi A.M., Hajighasemi S., Khori V., Soleimani M., Rajaei M., Rabbani S., Atashi A., Ghiaseddin A., Saeid A.K., Tafti H.A., Sahebkar A. Functional biological pacemaker generation by T-Box18 protein expression via stem cell and viral delivery approaches in a murine model of complete heart block // *Pharmacol. Res.* 2019. Vol. 141. P. 443–450.
110. Schweizer P.A., Darche F.F., Ullrich N.D., Geschwill P., Greber B., Rivinius R., Seyler C., Müller-Decker K., Draguhn A., Utikal J., Koenen M. Subtype-specific differentiation of cardiac pacemaker cell clusters from human induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Res. Ther.* 2017. Vol. 8. N 1: 229.
111. Naumova N., Iop L. Bioengineering the cardiac conduction system: advances in cellular, gene, and tissue engineering for heart rhythm regeneration // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 9: 673477.
112. Protze S.I., Liu J., Nussinovitch U., Ohana L., Backx P.H., Gepstein L., Keller G.M. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker // *Nat. Biotechnol.* 2017. Vol. 35. N 1. P. 56–68.
113. Cingolani E., Goldhaber J.I., Marbán E. Next-generation pacemakers: from small devices to biological pacemakers // *Nat. Rev. Cardiol.* 2018. Vol. 15. N 3. P. 139–150.
114. Quan D., Huang H. In vitro study of the effects of reprogramming neonatal rat fibroblasts transfected with TBX18 on spontaneous beating in neonatal rat cardiomyocytes // *Mol. Med. Rep.* 2018. Vol. 18. N 6. P. 5520–5526.
115. Zhang J., Huang C. A new combination of transcription factors increases the harvesting efficiency of pacemaker-like cells // *Mol. Med. Rep.* 2019. Vol. 19. N 5. P. 3584–3592.
116. Goodyer W.R., Beyersdorf B.M., Paik D.T., Tian L., Li G., Buikema J.W., Chirikian O., Choi S., Venkatraman S., Adams E.L., Tessier-Lavigne M. Transcriptomic profiling of the developing cardiac conduction system at single-cell resolution // *Circ. Res.* 2019. Vol. 125. N 4. P. 379–397.

Поступила в редакцию 29.07.2021

После доработки 16.09.2021

Принята в печать 16.10.2021

REVIEW

The molecular and cellular mechanisms of the heart pacemaker development in vertebrates

V.S. Kuzmin* , A.A. Kamensky

Department of Human and Animal Physiology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: kuzmin@mail.bio.msu.ru

A small cohort of a specialized myocytes in the intercaval region constitutes a dominant heart pacemaker, so called sinoatrial node (SAN). The SAN determines proper heart automaticity throughout life in mammals including human. A complicative histological organization, specific electrophysiology of pacemaker cardiomyocytes and unique genes expression pattern underlie SAN functioning. The development of the SAN starts very early in embryogenesis and continue till late prenatal period. The clarification of molecular mechanisms that underlie SAN origin facilitates bio-artificial pacemakers development, understanding of many cardiovascular diseases including hereditary, developmental or acquired arrhythmias. In addition, the advance in cardiac or somatic cell reprogramming that result from the understanding of SAN embryogenesis promotes cardiac cell-based repair, cell therapy and reversion of pathological remodeling in the heart. To date, a significant progress is achieved in the field of genetic and molecular pathways identification that control pacemaker calls nature, govern morphological and functional maturation of the cardiac pacemaker during ontogenesis. In this review a detailed overview of the key transcription factors, morphogenetic signaling molecules (BMP, podoplanin, VEGF, PDGF) and regulatory pathways (Wnt, Wt1, Slit/Robo, RhoA) involved in (epi)genetic control of the pacemaker myocytes progenitors specification and differentiation, as well as in the functional SAN development is presented.

Keywords: *heart, pacemaker, sinus venosus, sinoatrial node, ontogenesis, transcriptional control, automaticity, electrophysiological phenotype, review*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-14-50459.

Сведения об авторах

Кузьмин Владислав Стефанович – канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: kuzmin@mail.bio.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0003-3075-4834>

Каменский Андрей Александрович – докт. биол. наук, зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

ОБЗОР

УДК 57.013

**Наночастицы в водной среде:
риски и возможности их контроля с помощью микроводорослей****А.А. Гусев^{1, 2, 3} , О.В. Захарова^{1, 2, 3} , И.А. Васюкова¹ , Н.А. Евтушенко⁴ ,
С.Г. Васильева^{5, 6} , А.А. Лукьянов⁵ , Е.С. Лобакова^{5, 6} ,
Е.В. Скрипникова⁶, А.Е. Соловченко^{5, 6, *} **

¹Технопарк «Державинский», Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Россия, 392000, г. Тамбов, ул. Интернациональная, д. 33;

²Кафедра функциональных наносистем и высокотемпературных материалов, Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Россия, 119991, г. Москва, Ленинский просп., д. 4;

³Инжиниринговый центр, Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова, Россия, 117997, г. Москва, Стремянный пер., д. 36;

⁴Центр лесных биотехнологий дирекции, Институт инновационных технологий лесного комплекса, Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова, Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Тимирязева, д. 8;

⁵Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁶Институт естествознания, Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Россия, 392000, г. Тамбов, ул. Интернациональная, д. 33

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Наночастицы (НЧ) относятся к опасным микрополлютантам – загрязнителям, проявляющим биотоксичность в низких (порядка нг/л) концентрациях. НЧ могут не только напрямую влиять на живые организмы, но и служить переносчиками органических и неорганических загрязнителей, а также усиливать токсическое действие других микрополлютантов. НЧ все шире применяются в промышленных и бытовых целях, что влечет за собой рост объемов их производства, выбросов НЧ в окружающую среду и связанные с этим риски для экосистем. Эти риски усиливаются из-за стойкости НЧ к биодеструкции в природных экосистемах и традиционных очистных сооружениях, а эффективные технологии удаления НЧ сложны и дороги, поэтому их повсеместное внедрение на очистных сооружениях пока невозможно. Тем не менее, несмотря на риски, связанные с НЧ, человечество не откажется от их использования в ближайшем будущем, поскольку они прочно вошли в современный технологический уклад. Биодеструкция и биосорбция НЧ с применением культур микроводорослей и водорослево-бактериальных консорциумов считаются перспективными подходами с точки зрения безопасности для окружающей среды и сохранения природных ресурсов. Развитию этого подхода препятствует фрагментарность сведений о действии НЧ на клетки микроводорослей и микробные сообщества. Настоящий обзор – попытка заполнить этот пробел, по крайней мере, частично. В обзоре рассматриваются распространенные типы промышленных НЧ на основе металлов и их оксидов, а также углеродные наноматериалы. Обсуждаются пути их поступления в водную среду, токсичность для живых организмов, накопление и пути трансформации в клетках, синергетические эффекты НЧ, тяжелых металлов и антибиотиков, а также способы биоудаления НЧ и наноматериалов из водных экосистем с помощью микроводорослей.

Ключевые слова: наночастицы, микроводоросли, биотоксичность, биоудаление, сточные воды, микрополлютанты

Загрязнители, проявляющие биотоксичность в малых (порядка нг/л) концентрациях, получили особое название – опасные микрополлютанты (ОМП; в англоязычной литературе – emerging/hazardous micropollutants) [1]. Они представлены лекарствами, антисептиками, средствами личной гигиены, пищевыми добавками, пестицидами, пластификаторами, природными и синтетическими гормонами, тяжелыми металлами, а также наночастицами (НЧ). Шире остальных применяют-

ся металлические и металлоксидные НЧ из серебра (Ag) [2], оксида цинка (ZnO) [3] и диоксида титана (TiO₂) [4]. Все чаще упоминаются НЧ из нуль-валентного железа (nZVI – nano zero-valent iron) [5], меди (Cu) и оксида меди (CuO) [6], алюминия (Al) и оксида алюминия (Al₂O₃) [7], золота (Au) [8], а также ряда других веществ [9].

НЧ и наноматериалы все шире применяются в промышленных и бытовых целях, что влечет неуклонный рост объемов их производства. Ожидает-

мый в период 2020–2025 гг. годовой прирост мирового рынка НЧ из оксидов металлов и металлоидов составит 7% [10]. Годовой объем мирового производства НЧ на основе TiO_2 и ZnO превышает сотни тонн [11]. Соответственно, растут выбросы НЧ в окружающую среду и вместе с этим – риски неблагоприятного воздействия на природные системы. Все больше внимания привлекают исследования влияния НЧ на водные и наземные экосистемы. НЧ могут не только напрямую влиять на живые организмы, но и служить переносчиками органических и неорганических загрязнителей, а также усиливать токсическое действие других ОМП. Стойкость к биодеструкции в природных экосистемах и традиционных очистных сооружениях обостряет проблемы, связанные с накоплением НЧ в окружающей среде. Тем не менее, несмотря на связанные с НЧ риски, человечество не откажется от их использования в ближайшем будущем, поскольку они широко используются в современных технологиях.

Эффективные технологии удаления ОМП (включая НЧ), основанные на химической сорбции и окислительной деструкции, сложны и дороги, поэтому их повсеместное внедрение на очистных сооружениях пока невозможно. Опасность представляют и продукты реакций окисления ОМП, которые могут быть еще более токсичными. С другой стороны, биодеструкция и биосорбция (биоцентрирование) с применением культур микроводорослей и водорослево-бактериальных консорциумов (ВБК) считается одним из наиболее перспективных подходов с точки зрения безопасности для окружающей среды и сохранения природных ресурсов. Однако развитию этого подхода препятствуют недостаток и фрагментарность сведений о действии НЧ на микроводоросли, а также включающие их микробные сообщества, в природных и искусственных экосистемах. Данные о распространении, эффектах и трансформации антибиотиков и иных фармпрепаратов в природе и в очистных сооружениях довольно хорошо систематизированы, чего нельзя сказать про сведения о НЧ. Анализ последних обзоров о влиянии металлических НЧ на экосистемы, в том числе водные [12–15], свидетельствует о том, что, несмотря на активные исследования, в наших знаниях существуют пробелы из-за недостатка результатов моделирования и полевых исследований. Главным источником неопределенности является отсутствие данных о концентрациях НЧ в окружающей среде и дозиметрии НЧ в целом [13]. Настоящий обзор – попытка заполнить этот пробел, по крайней мере, частично. В статье рассматриваются распространенные типы промышленных НЧ на основе металлов и их оксидов, а также углеродные наноматериалы. Обсуждаются пути их поступления в водную среду, токсичность для живых организмов, накопление и пути трансформации

в клетках, синергетические эффекты НЧ, тяжелых металлов и антибиотиков, а также способы биоудаления НЧ и наноматериалов из водных экосистем с помощью микроводорослей.

Источники поступления наночастиц в окружающую среду

Существуют три возможных сценария попадания НЧ в природные экосистемы, в том числе водные: во время производства, во время эксплуатации и после захоронения продуктов, содержащих НЧ. Из производимых наноматериалов 63–91% в итоге попадают на свалки, 8–28% – в почвы, 0,4–0,7% – в естественные водоемы, а 0,1–1,5% – в атмосферу [16]. Так, показано, что 1 м² коммерчески доступного самоочищающегося цемента после 168 ч выщелачивания выделяет 18,7–33,5 мг НЧ TiO_2 [17], а фасадные краски с НЧ TiO_2 под действием погодных условий освобождают эти НЧ, которые затем переносятся стоками в водоемы [18]. Использование НЧ TiO_2 и ZnO в косметической продукции также приводит к их поступлению в водоемы [19]. Так, с помощью электронной микроскопии удалось идентифицировать НЧ TiO_2 из солнцезащитных кремов во взвешенном веществе озера Старый Дунай (Вена, Австрия), их содержание увеличивалось в летний сезон [20]. Растет популярность текстиля, содержащего НЧ с бактерицидными свойствами, высвобождающего эти НЧ, например, при стирке [21]. Так, микроскопия показала, что из носков, содержащих наносеребро, освобождаются в стирочные воды частицы серебра диаметром от 10 до 500 нм [22].

В водную среду также попадают НЧ, образующиеся в результате природных явлений, таких как вулканическая активность, и при промышленных процессах, таких как резка, шлифование, плавка, литье, сварка и др. [23]. Например, в дорожной пыли обнаружены НЧ с аномально высокими концентрациями Cu , Zn , Ag , Cd , Sn , Sb , Hg , Pb , Tl , Bi [24]. Со сточными водами такие НЧ могут попадать в водные экосистемы. Выбросы металлических НЧ возможны и при их применении для ремедиации почв и подземных вод, как в случае с нуль-валентным железом [25], а также при обработке растений регуляторами роста и пестицидами на основе НЧ [26].

Углеродные наноструктуры – наноразмерные аллотропные модификации углерода, включающие представителей нуль- (квантовые точки, фуллерены), одно- (нанотрубки) и двумерных (графены) типов НЧ, широко распространены и активно производятся в настоящее время. Их применяют во многих отраслях промышленности, сельского хозяйства и медицины. Благодаря большому разнообразию структур и уникальным физико-химическим свойствам, на основе углеродных НЧ разрабатываются агенты для адресной доставки

лекарств, фото-, радио- и генной терапии [27, 28], антибактериальные препараты [29], биосенсоры [30], сенсоры для мониторинга загрязнений [31], адсорбенты для очистки сточных вод [32] и др. Все это существенно увеличивает объемы поступления этих НЧ в экосистемы. В водную среду углеродные НЧ могут переходить из аэрозолей, образующихся в результате лесных и степных пожаров, палов, извержения вулканов, сжигания сельскохозяйственных отходов, использования углеводородного топлива на электростанциях. Источниками НЧ могут выступать природная нефть и битумы [33]. В связи с этим их воздействие в той или иной степени испытывают на себе все живые организмы. В последнее десятилетие в число источников НЧ вошли очистные сооружения [34] и объекты промышленного производства, на которых синтезируют или используют углеродные наноструктуры [34]. На сегодняшний день нет точных данных о концентрациях углеродных НЧ в водной среде, однако расчетные концентрации углеродных нанотрубок (УНТ) и графена в природных средах составляют 0,001–1000 мкг/л [35].

Таким образом, рост выбросов в водную среду НЧ на основе металлов, их оксидов, а также углеродных наноматериалов в связи с широким распространением продукции наноиндустрии, а также вследствие природных и техногенных процессов является общим трендом, способным привести к непредсказуемым экологическим эффектам.

Токсическое воздействие наночастиц на человека и животных

НЧ металлов и оксидов металлов могут оказывать влияние на организм человека как при их преднамеренном использовании в наномедицине, приеме с пищей или в составе средств личной гигиены [36], так и в результате непреднамеренной экспозиции в ходе производственных, природных и других процессов, при применении НЧ в сельском хозяйстве и т.д. [10]. Число работ о прямом влиянии металлических и металлооксидных НЧ на здоровье человека невелико. Однако многие исследования, посвященные влиянию НЧ на клетки человека и экспериментальных животных в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют об их потенциальной опасности для человека. НЧ металлов и их оксидов обладают цито- и генотоксичностью, вызывая окислительное повреждение ДНК и гибель клеток [37]. Исследования *in vivo* показали, что различные типы металлических НЧ проявляют тенденцию к формированию отложений в печени, вызывая токсические эффекты [38]. Кроме того, НЧ могут накапливаться в пищеварительном тракте, легких, сердце, селезенке, сердечной мышце и почках [39, 40]. Установлено, что металлические НЧ могут перемещаться в центральную нервную систему через поврежденный гематоэнцефалический барьер и стимулировать

активацию глиальных клеток для высвобождения провоспалительных цитокинов и генерации активных форм кислорода (АФК), а также продукцию оксида азота, что приводит к нейровоспалению [41].

Биобезопасность углеродных наноматериалов также вызывает ряд сомнений. Благодаря своей устойчивости и подвижности, эти наноструктуры способны к биоконцентрированию и миграции по пищевым цепям [42]. Многократно подтверждались как общетоксическое действие, так и избирательная токсичность УНТ для дыхательной [43], пищеварительной [44], репродуктивной [45] систем млекопитающих. Токсическое действие на млекопитающих оказывает и графен, поскольку его НЧ способны агрегировать в тканях и вызывать окислительный стресс, повреждающий клетки легких, печени, селезенки, почек [46] и роговицы глаз [47].

Таким образом, НЧ металлов и их оксидов, а также углеродные наноматериалы обладают доказанной токсичностью для млекопитающих, а в некоторых случаях и для человека. В этой связи особую актуальность приобретает поиск средств для снижения содержания НЧ в окружающей среде.

Воздействие наночастиц на гидробионтов

Влияние НЧ на гидробионтов определяется химическим составом воды, включая содержание растворенного органического вещества (dissolved organic matter, DOM), ионную силу и pH [48], а также освещенностью и температурой [49]. DOM может адсорбироваться на поверхности НЧ, образуя тонкие пленки, изменяя их функциональную поверхность и повышая их агрегативную устойчивость [50]. Покрытие из DOM может ограничивать высвобождение ионов из НЧ в воду [51], повышать способность НЧ к миграции и диффузии [52], влиять на их токсичность [53]. Ионная сила и pH водоемов могут изменять параметры водных суспензий НЧ, что также влияет на адсорбцию DOM [49].

Температура – важный детерминант роста и продуктивности первичных продуцентов, таких как микроводоросли. Показано, что при повышении температуры увеличивается скорость суспендирования НЧ [54]. Это может увеличивать их токсичность для микроводорослей. Кроме того, некоторые НЧ (TiO_2 , ZnO) являются полупроводниками с фотокаталитическими и фотодинамическими свойствами. При облучении ультрафиолетовой радиацией такие НЧ могут генерировать АФК, оказывающие токсическое действие на клетки микроводорослей [55]. НЧ, такие как частицы ZnO, могут проникать в цитоплазму, повреждая органеллы и субклеточные структуры, включая хлоропласты, вакуоли, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и митохондрии, либо изменяя их функциональность [56].

Имеется ряд сведений и о токсичности углеродных наноструктур для гидробионтов. Считается, что НЧ редко обладают острой токсичностью в отношении микроводорослей, однако в литературе имеются свидетельства о структурных и негативных функциональных нарушениях клеток микроводорослей (при длительном контакте с НЧ). Так, восстановленный оксид графена с пришитыми НЧ ZrO_2 индуцировал цитотоксический эффект у микроводорослей *Chlorella pyrenoidosa*, вызывая окислительный стресс и функциональные изменения клеточных мембран [57]. Оксид графена и восстановленный оксид графена замедляли деление клеток, повреждали клеточные мембраны клеток *C. pyrenoidosa*, а также снижали биодоступность питательных веществ для микроводорослей за счет адсорбции на поверхности НЧ [58]. Фуллерены в сублетальной концентрации снижали содержание хлорофилла и активность Mg^{2+} -АТФазы, ингибируя деление клеток *Scenedesmus obliquus* [59]. Двухслойные УНТ ингибируют деление клеток диатомовых водорослей *Thalassiosira pseudonana* и рост ракообразных *Tigriopus japonicus* уже в концентрации 0,1 мг/л, при этом концентрация НЧ, вдвое снижающая скорость роста (50% effect concentration, EC_{50}), составляет всего 1,86 мг/л [60]. Задержка роста и развития наблюдалась и в экспериментах с *Pseudokirchneriella subcapitata* ($EC_{50} = 17,95$ мг/л и 10,93 мг/л для чистых и окисленных двухслойных УНТ соответственно) [61]. В качестве механизма токсического действия на водоросли рассматриваются как прямое повреждение клеточных структур, так и нарушение трофики и фотосинтеза вследствие налипания углеродных наноструктур на поверхность клеток микроводорослей.

Задержка роста и развития под действием УНТ наблюдалась и у *Daphnia pulex* (полулетальная концентрация, $LC_{50} = 2,81$ и 4,45 мг/л для чистых и окисленных двухслойных УНТ соответственно) [61]. Графен, фуллерен C_{60} , одно- и многослойные УНТ в низких концентрациях стимулировали рост и размножение *D. magna*, вероятно, за счет адсорбции питательных веществ на поверхности НЧ, способствовавшей увеличению их поглощения дафниями. Однако с увеличением концентрации НЧ наблюдали усиление токсичности, проявлявшейся в подавлении роста и размножения [62]. В некоторых исследованиях не обнаружено острой токсичности УНТ и фуллерена C_{60} для *D. magna*, но и через 48 ч НЧ оставались в кишечнике дафний [63], что повышает вероятность переноса углеродных наноструктур на следующий трофический уровень пищевой цепи. Многослойные УНТ при 28-суточной экспозиции в концентрации 0,01–1 мг/л оказывали нейротоксическое действие на моллюсков *Ruditapes philippinarum* [64]. Оксид графена в концентрации 0,4–1 мг/л вызывал значительную эмбриональную смертность,

задержку вылупления, кардиотоксичность и развитие сердечно-сосудистых дефектов у эмбрионов рыб *Danio rerio* [65]. Композит из восстановленного оксида графена с TiO_2 в концентрации 30 мкг/мл не оказывал токсического действия на эмбрионы *D. rerio*, однако при увеличении концентрации до 1 мг/мл наблюдались тератогенный и кардиотоксический эффекты [66]. При хроническом воздействии на взрослых особей *D. rerio* оксид графена индуцировал генерацию АФК в клетках, повреждая жабры и печень [67]. Токсические эффекты графена у *D. rerio* наблюдались и в других работах [68]. Подавление роста наблюдалось и у *Oryzias melastigma* при действии 10 мг/л двухслойных УНТ [60]. Однако следует отметить, что токсичность углеродных наноструктур для рыб ниже, чем для других гидробионтов. Таким образом, анализ литературных источников свидетельствует об уязвимости гидробионтов для металлических, металлоксидных и углеродных НЧ.

Синергизм опасных микрополлютантов

Гидробионты обычно подвергаются воздействию многокомпонентных смесей ОМП, включающих различные НЧ. НЧ металлов и оксидов металлов являются эффективным адсорбентом для различных ОМП, включая ионы других тяжелых металлов и антибиотики [69]. Высокая сорбция ОМП на металлических НЧ обусловлена наличием на их поверхности частиц координационных центров (выступы, края, изгибы или угловые участки) [70]. Так, присутствие НЧ TiO_2 в концентрации 1 мг/л увеличило токсичность ионов Zn^{2+} для цианобактерии *Anabaena* sp., но при увеличении концентрации TiO_2 до 10 мг/л токсичность системы Zn^{2+}/TiO_2 снижалась из-за адсорбции большей части Zn^{2+} на поверхности TiO_2 [71–73]. Тест с дихлородигидрофлуоресцеиндиацетатом ($H_2DCF-DA$) показал повышение уровня АФК в клетках микроводорослей под действием системы Zn^{2+}/TiO_2 ; при увеличении концентрации Zn^{2+} выше 0,7 мг/л наблюдали деструкцию клеток [71]. Сходные результаты были получены в экспериментах по оценке токсичности мышьяка в присутствии НЧ TiO_2 по отношению к *Ceriodaphnia dubiac* [72]. Показано снижение токсичности тяжелых металлов для зеленых микроводорослей в присутствии НЧ TiO_2 [73], однако в эксперименте с *D. magna* и *Lumbriculus variegatus* НЧ не влияли на поглощение и токсичность Cd^{2+} [74].

Анализ доступных авторам обзора публикаций позволяет утверждать, что НЧ, являясь эффективным сорбентом, могут снижать токсичность тяжелых металлов. Показана также адсорбция антибиотиков на НЧ Al_2O_3 [75] и TiO_2 [76]. Однако, в отличие от комплексов НЧ с тяжелыми металлами, комплексы НЧ с антибиотиками токсичнее, чем антибиотики и НЧ по отдельности

[77]. Действие антибиотиков (азитромицин, цефотаксим, цефуросим, фосфомоцин и хлорамфеникол) против *Escherichia coli* усиливается в присутствии НЧ Ag, но антибактериальное действие НЧ Ag с оксациллиновыми и неомидиновыми антибиотиками против *Staphylococcus aureus* было значительно слабее, чем действие одних антибиотиков [78]. Комбинации «тетрацилин + НЧ Ag», а также «неомидин + НЧ Ag» сильнее ингибировали рост *Salmonella typhimurium* DT104 по сравнению с действием только антибиотика, в то же время в комбинации «пенициллин + НЧ Ag» усиления действия антибиотика на данный штамм бактерий не наблюдали. Потенцирование действия антибиотика, вероятно, обусловлено усилением бактериального связывания НЧ Ag под действием тетрацилина или неомидина, но не пенициллина [79]. В комбинации карвакрола с НЧ ZnO усиливался противомикробный эффект против *Campylobacter jejuni* [80]. Предполагается, что НЧ способствуют проникновению антибиотиков в клетку, изменяя проницаемость мембраны, а затем совместно с ними разрушают клеточную стенку [80]. Другой механизм токсического действия комплекса «НЧ + антибиотик» может быть опосредован генерацией АФК. Комплекс «НЧ + Ag-канамицин» генерирует значительно больше АФК по сравнению с системой, содержащей только антибиотик или только НЧ [81].

Немодифицированные углеродные наноструктуры могут быть безопасны для живых организмов [82], однако функционализация поверхности или взаимодействие с другими поллютантами могут дать синергетический эффект, значительно усиливая их биодоступность и токсичность [83]. При этом поведение наноструктур при взаимодействии с другими поллютантами довольно трудно предсказать. Например, УНТ в водной среде с высокой скоростью адсорбируют на своей поверхности ионы Cd, втрое увеличивая токсичность Cd для *D. magna* [84]. Гербицид диурон в присутствии различных многослойных УНТ (промышленных, очищенных, нефункционализированных и окисленных) активно сорбировался на поверхности УНТ, оставаясь биодоступным для зеленой микроводоросли *C. vulgaris*, что привело к увеличению токсичности гербицида в пять раз [85].

Поверхностные свойства функционализированных многослойных УНТ по-разному влияли на токсичность свинца для *D. magna* [86]. Отрицательно заряженные карбоксилатные многослойные УНТ заметно снижали токсичность свинца (LC_{50} увеличилась с 0,15 до 1,08 мг/л в присутствии 10 мг/л многослойных УНТ). Напротив, положительно заряженные многослойные УНТ, модифицированные полиэтиленгликолем, лишь незначительно влияли на токсичность свинца (LC_{50} увеличилась с 0,15 до 0,16 мг/л в тех же условиях). Снижение токсичности свинца было свя-

зано со снижением биодоступности свободной металлической формы (Pb^{2+}) при адсорбции на поверхности многослойных УНТ [86].

Несмотря на то, что и УНТ, и НЧ Cu в водной среде ингибируют рост микроводорослей *Skeletonema costatum*, УНТ способны адсорбировать НЧ Cu, снижая тем самым ее токсичность [87].

Благодаря высоким показателям удельной поверхности и сорбционной способности, углеродные наноструктуры, особенно графен и УНТ, все чаще рассматриваются в качестве материалов-сорбентов с антибактериальным эффектом для очистки сточных вод. Экспериментально доказана их способность сорбировать из водных растворов поверхностно-активные вещества [88], тяжелые металлы [89], органические вещества и красители [90], антибиотики [91] и радиоактивные отходы [92]. Исследования показали, что многослойные УНТ могут удалять из водного раствора до 99% Zn^{2+} [93].

Анализ вышеупомянутых публикаций позволяет заключить, что НЧ и наноматериалы способны, в зависимости от свойств самих НЧ, условий среды и присутствия других веществ, как усиливать, так и ослаблять токсическое действие других поллютантов в водной среде, таких как тяжелые металлы и антибиотики.

Потенциал микроводорослей для удаления наночастиц из сточных вод

Способность водорослей адсорбировать НЧ металлов и их оксидов была показана в ряде исследований [94–96]. Мариано и соавт. обнаруживали интернализированные НЧ Ag внутри крупных вакуолей *C. vulgaris*; эти НЧ не высвобождались в среду даже через неделю и не подвергались биотрансформации [97]. После 4-часовой инкубации *C. vulgaris* с НЧ Ag в концентрации 2 мг/л содержание этих НЧ Ag в клетках микроводорослей достигало 1200–3300 мкг/г сухой массы [98], а микроводоросль *Raphidocelis subcapitata* аккумулировала НЧ Ag в количестве 45 и 93,7 мкг/г сухого веса после 24-часовой инкубации с этими НЧ в концентрации 15 и 30 мкг/л соответственно [99].

Для проникновения в клетку микроводоросли НЧ должна преодолеть клеточную стенку, содержащую целлюлозу и другие полисахариды, а также гликопротеины, и цитоплазматическую мембрану. Методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что НЧ CuO прикреплялись к поверхности клеток микроводорослей и взаимодействовали с экзополисахаридным матриксом, способствующим адсорбции НЧ клетками микроводорослей. Просвечивающей электронной микроскопией выявлено четырехкратное утолщение экзополисахаридного слоя после воздействия НЧ, что указывает на возможную защитную роль этого слоя клеточной стенки микроводорослей. Однако, несмотря на утолщение экзополисахаридного

слоя, НЧ проникали через цитоплазматическую мембрану путем эндоцитоза и откладывались в клеточных вакуолях [49, 56].

Попадая в клетки, металлические НЧ могут претерпевать изменения, включая окисление-восстановление и комплексообразование [100], либо растворяться в кислой среде лизосом [101]. Последний механизм обеспечивает транспортировку ионов токсичных металлов в клетки. Для микроводорослей описано попадание НЧ Ag в периплазматическое пространство через 48 ч инкубации с НЧ [102]. С помощью синхротронной рентгеновской абсорбционной спектроскопии было установлено, что внутри цитоплазмы Ag присутствует как в кристаллической, так и в аморфной формах, идентифицированных как β -Ag₂S и тиолаты серебра. Эти работы убедительно доказывают способность клеток микроводорослей интернализировать и биотрансформировать НЧ Ag.

Углеродные наноструктуры, попадая в водные экосистемы, вовлекаются в разнообразные процессы трансформации, включая гомо- и гетероагрегацию, агломерацию, седиментацию, окисление, сульфидирование, а также процессы биодеградации и биомодификации, что сказывается на их свойствах [103]. Имеются данные о биоаккумуляции углеродных наноструктур клетками микроводорослей, простейших, моллюсков, ракообразных и рыб [104]. Процессы биодеградации углеродных наноструктур в естественной среде происходят с помощью ферментативного катализа [105], например, с участием пероксидаз в соответствующих субкомпартаментах клеток гидробионтов [105].

Заключение

Настоящий обзор – попытка сжато систематизировать сведения о наиболее распространенных типах НЧ, связанных с ними рисках, поступлении в водную среду и путях биотрансформации в клетках гидробионтов. Даже столь краткое рассмотрение показывает, как велики пробелы в наших

знаниях об этих процессах. Необходимость заполнения этих пробелов тем острее, чем быстрее и шире распространяются технологии, использующие НЧ и наноматериалы. При этом НЧ – «обоюдоострое оружие», которое может быть как опасным токсикантом, так и мощным средством устранения загрязнителей из сточных вод и окружающей среды. Особое внимание в обзоре уделено потенциалу использования одноклеточных оксигенных фототрофов (эукариотических микроводорослей и цианобактерий) как основы для создания биотехнологий, обеспечивающих эффективное и экономически доступное биоудаление ОМП. Потенциальные пути связывания (биоцентрирования) и устранения НЧ с помощью клеток микроводорослей включают поглощение и накопление НЧ в клеточных компартаментах, агрегацию, седиментацию, химическую модификацию (окисление, восстановление, сульфидирование и комплексообразование), а также ферментативную биодеградацию. При этом важными факторами являются исходная концентрация НЧ, pH среды, а также метаболическая и физиологическая пластичность клеток микроводорослей. Однако раскрытие потенциала микроводорослей как компонентов биотехнологии для снижения рисков, связанных с НЧ, требует большого объема исследований с целью расшифровки механизмов толерантности к НЧ и поиска эффективных штаммов – биоцентрираторов и биодеструкторов этих частиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-20004, анализ данных по НЧ оксидов металлов и углерода) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект «Аспиранты» № 20-34-90115, анализ данных по металлическим НЧ). Работу проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nguyen H.T., Yoon Y., Ngo H.H., Jang A. The application of microalgae in removing organic micropollutants in wastewater // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2021. Vol. 51. P. 1187–1220.
2. Xu L., Wang Y.-Y., Huang J., Chen C.-Y., Wang Z.-X., Xie H. Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety // *Theranostics.* 2020. Vol. 10. N 20. P. 8996–9031.
3. Jiang J., Pi J., Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications // *Bioinorg. Chem. Appl.* 2018. Vol. 2018: 1062562.
4. Ziental D., Czarzynska-Goslinska B., Mlynarczyk D.T., Glowacka-Sobotta A., Stanisz B., Goslinski T., Sobotta L. Titanium dioxide nanoparticles: prospects and applications in medicine // *Nanomaterials.* 2020. Vol. 10. N 2: 387.
5. Li J., Li C., Zhao L., Pan X., Cai G., Zhu G. The application status, development and future trend of nano-iron materials in anaerobic digestion system // *Chemosphere.* 2021. Vol. 269: 129389.
6. Bezza F.A., Tichapondwa S.M., Chirwa E.M.N. Fabrication of monodispersed copper oxide nanoparticles with potential application as antimicrobial agents // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. N 1: 16680.
7. Hassanpour P., Panahi Y., Ebrahimi-Kalan A., Akbarzadeh A., Davaran S., Nasibova A., Khalilov R., Kavetskiy T. Biomedical applications of aluminium oxide nanoparticles // *Micro Nano Lett.* 2018. Vol. 13. N 9. P. 1227–1231.
8. Jahangirian H., Kalantari K., Izadiyan Z., Rafiee-Moghaddam R., Shameli K., Webster T.J. A review of small

molecules and drug delivery applications using gold and iron nanoparticles // *Int. J. Nanomed.* 2019. Vol. 14. P. 1633–1657.

9. Yonezawa T. Application 78 – Preparation of metal nanoparticles and their application for materials // *Nanoparticle technology handbook*. 3rd Ed. / Eds. M. Naito, T. Yokoyama, K. Hosokawa, and K. Nogi. Amsterdam: Elsevier, 2018. P. 829–837.

10. Soares E.V., Soares H.M.V.M. Harmful effects of metal(loid) oxide nanoparticles // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021. Vol. 105. P. 1379–1394.

11. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world // *J. Nanopart. Res.* 2012. Vol. 14. N 9: 1109.

12. Meyer J.S., Lyons-Darden T., Garman E.R., Middleton E.T., Schlekot C.E. Toxicity of nanoparticulate nickel to aquatic organisms: review and recommendations for improvement of toxicity tests // *Environ. Toxicol. Chem.* 2020. Vol. 39. N 10. P. 1861–1883.

13. Lead J.R., Batley G.E., Alvarez P.J.J., Croteau M.-N., Handy R.D., McLaughlin M.J., Judy J.D., Schirmer K. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects—an updated review // *Environ. Toxicol. Chem.* 2018. Vol. 37. N 8. P. 2029–2063.

14. Déniel M., Errien N., Daniel P., Caruso A., Lagarde F. Current methods to monitor microalgae-nanoparticle interaction and associated effects // *Aquat. Toxicol.* 2019. Vol. 217: 105311.

15. Pulido-Reyes G., Leganes F., Fernández-Piñas F., Rosal R. Bio-nano interface and environment: a critical review // *Env. Toxicol. Chem.* 2017. Vol. 36. N 12. P. 3181–3193.

16. Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials // *J. Nanopart. Res.* 2013. Vol. 15. N 6: 1692.

17. Bossa N., Chaurand P., Levard C., Borschneck D., Miche H., Vicente J., Geantet C., Aguerre-Chariol O., Michel F.M., Rose J. Environmental exposure to TiO₂ nanomaterials incorporated in building material // *Environ. Pollut.* 2017. Vol. 220. P. 1160–1170.

18. Kaegi R., Ulrich A., Sinnet B., Vonbank R., Wichser A., Zuleeg S., Simmler H., Brunner S., Vonmont H., Burkhardt M., Boller M. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment // *Environ. Pollut.* 2008. Vol. 156. N 2. P. 233–239.

19. Bundschuh M., Filser J., Lüderwald S., McKee M.S., Metreveli G., Schaumann G.E., Schulz R., Wagner S. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? // *Environ. Sci. Eur.* 2018. Vol. 30. N 1: 6.

20. Gondikas A.P., Kammer F. v.d., Reed R.B., Wagner S., Ranville J.F., Hofmann T. Release of TiO₂ Nanoparticles from sunscreens into surface waters: a one-year survey at the old danube recreational lake // *Environ. Sci. Technol.* 2014. Vol. 48. N 10. P. 5415–5422.

21. Andra S., Balu S.K., Jeevanandam J., Muthalagu M. Emerging nanomaterials for antibacterial textile fabrication // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2021. Vol. 394. N 7. P. 1355–1382.

22. Benn T.M., Westerhoff P. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics // *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. N 11. P. 4133–4139.

23. Sawicki K., Czajka M., Matysiak-Kucharek M., Fal B., Drop B., Męczyńska-Wielgosz S., Sikorska K.,

Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak L. Toxicity of metallic nanoparticles in the central nervous system // *Nanotechnol. Rev.* 2019. Vol. 8. N 1. P. 175–200.

24. Ermolin M.S., Fedotov P.S., Ivaneev A.I., Karandashev V.K., Fedyunina N.N., Eskina V.V. Isolation and quantitative analysis of road dust nanoparticles // *J. Anal. Chem.* 2017. Vol. 72. N 5. P. 520–532.

25. Galdames A., Ruiz-Rubio L., Orueta M., Sánchez-Arzalluz M., Vilas-Vilela J.L. Zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020. Vol. 17. N 16: 5817.

26. Pirzadah B., Pirzadah T.B., Jan A., Hakeem K.R. Nanofertilizers: a way forward for green economy // *Nanobiotechnology in agriculture: an approach towards sustainability* / Eds. K.R. Hakeem and T.B. Pirzadah. Cham: Springer. P. 99–112.

27. Rani U.A., Ng L.Y., Ng C.Y., Mahmoudi E. A review of carbon quantum dots and their applications in wastewater treatment // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2020. Vol. 278: 102124.

28. Efimova S.S., Khaleneva D.A., Litasova E.V., Piotrovskiy L.B., Ostroumova O.S. The mechanisms of action of water-soluble aminohexanoic and malonic adducts of fullerene C₆₀ with hexamethonium on model lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2020. Vol. 1862. N 11: 183433.

29. Moradlou O., Rabiei Z., Delavari N. Antibacterial effects of carbon quantum dots–hematite nanostructures deposited on titanium against gram-positive and gram-negative bacteria // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2019. Vol. 379. P. 144–149.

30. Joshi P., Mishra R., Narayan R.J. Biosensing applications of carbon-based materials // *Curr. Opin. Biomed. Eng.* 2021. Vol. 18: 100274.

31. Li H.-Y., Li D., Guo Y., Yang Y., Wei W., Xie B. On-site chemosensing and quantification of Cr(VI) in industrial wastewater using one-step synthesized fluorescent carbon quantum dots // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. Vol. 277. P. 30–38.

32. Fallah Z., Zare E.N., Ghomi M., Ahmadijokani F., Amini M., Tajbakhsh M., Arjmand M., Sharma G., Ali H., Ahmad A., Makvandi P., Lichtfouse E., Sillanpää M., Varma R.S. Toxicity and remediation of pharmaceuticals and pesticides using metal oxides and carbon nanomaterials // *Chemosphere.* 2021. Vol. 275: 130055.

33. Velasco-Santos C., Martínez-Hernández A.L., Con-sultchi A., Rodríguez R., Castaño V.M. Naturally produced carbon nanotubes // *Chem. Phys. Lett.* 2003. Vol. 373. N 3–4. P. 272–276.

34. Bäuerlein P.S., Emke E., Tromp P., Hofman J.A.M.H., Carboni A., Schooneman F., de Voogt P., van Wezel A.P. Is there evidence for man-made nanoparticles in the Dutch environment? // *Sci. Total Environ.* 2017. Vol. 576. P. 273–283.

35. De Marchi L., Pretti C., Gabriel B., Marques P.A.A.P., Freitas R., Neto V. An overview of graphene materials: properties, applications and toxicity on aquatic environments // *Sci. Total Environ.* 2018. Vol. 631. P. 1440–1456.

36. Di Felice G., Colombo P. Nanoparticle-allergen complexes for allergen immunotherapy // *Int. J. Nanomed.* 2017. Vol. 12. P. 4493–4504.

37. Singh S.P., Chinde S., Kamal S.S., Rahman M.F., Mahboob M., Grover P. Genotoxic effects of chromium

oxide nanoparticles and microparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral exposure // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016. Vol. 23. N 4. P. 3914–3924.

38. Liu F., Chang X., Tian M., Zhu A., Zou L., Han A., Su L., Li S., Sun Y. Nano NiO induced liver toxicity via activating the NF- κ B signaling pathway in rats // *Toxicol. Res.* 2017. Vol. 6. N 2. P. 242–250.

39. Shabbir S., Kulyar M.F. Toxicological consequences of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) and their jeopardy to human population // *Bionanoscience*. 2021. Vol. 11. N 2. P. 621–632.

40. Baranowska-Wójcik E., Sz wajgier D., Oleszczuk P., Winiarska-Mieczan A. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on human health—a review // *Biol. Trace Elem. Res.* 2020. Vol. 193. N 1. P. 118–129.

41. Wu T., Tang M. The inflammatory response to silver and titanium dioxide nanoparticles in the central nervous system // *Nanomedicine*. 2018. Vol. 13. N 2. P. 233–249.

42. Sarma S.J., Bhattacharya I., Brar S.K., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. Carbon nanotube—bioaccumulation and recent advances in environmental monitoring // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 2015. Vol. 45. N 9. P. 905–938.

43. Khaliullin T.O., Yanamala N., Newman M.S., Kisin E.R., Fatkhutdinova L.M., Shvedova A.A. Comparative analysis of lung and blood transcriptomes in mice exposed to multi-walled carbon nanotubes // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2020. Vol. 390: 114898.

44. Adedara I.A., Anao O.O., Forcados G.E., Awogbindin I.O., Agbowo A., Ola-Davies O.E., Patlolla A.K., Tchounwou P.B., Farombi E.O. Low doses of multi-walled carbon nanotubes elicit hepatotoxicity in rats with markers of oxidative stress and induction of pro-inflammatory cytokines // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2018. Vol. 503. N 4. P. 3167–3173.

45. Liu X., Liu T., Song J., Hai Y., Luan F., Zhang H., Yuan Y., Li H., Zhao C. Understanding the interaction of single-walled carbon nanotube (SWCNT) on estrogen receptor: A combined molecular dynamics and experimental study // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. Vol. 172. P. 373–379.

46. Sasidharan A., Swaroop S., Koduri C.K., Girish C.M., Chandran P., Panchakarla L.S., Somasundaram V.H., Gowd G.S., Nair S., Koyakutty M. Comparative in vivo toxicity, organ biodistribution and immune response of pristine, carboxylated and PEGylated few-layer graphene sheets in Swiss albino mice: a three month study // *Carbon*. 2015. Vol. 95. P. 511–524.

47. An W., Zhang Y., Zhang X., Li K., Kang Y., Akhtar S., Sha X., Gao L. Ocular toxicity of reduced graphene oxide or graphene oxide exposure in mouse eyes // *Exp. Eye Res.* 2018. Vol. 174. P. 59–69.

48. Cupi D., Hartmann N.B., Baun A. Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2016. Vol. 127. P. 144–152.

49. Wang F., Guan W., Xu L., Ding Z., Ma H., Ma A., Terry N. Effects of nanoparticles on algae: adsorption, distribution, ecotoxicity and fate // *Appl. Sci.* 2019. Vol. 9. N 8: 1534.

50. Lee S., Kim K., Shon H.K., Kim S.D., Cho J. Bio-toxicity of nanoparticles: effect of natural organic matter // *J. Nanopart. Res.* 2011. Vol. 13. N 7. P. 3051–3061.

51. Levard C., Hotze E.M., Lowry G.V., Brown G.E. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity // *Environ. Sci. Technol.* 2012. Vol. 46. N 13. P. 6900–6914.

52. Wang Z., Zhang L., Zhao J., Xing B. Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter // *Environ. Sci. Nano*. 2016. Vol. 3. N 2. P. 240–255.

53. Collin B., Tsyusko O.V., Starnes D.L., Unrine J.M. Effect of natural organic matter on dissolution and toxicity of sulfidized silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans* // *Environ. Sci. Nano*. 2016. Vol. 3. N 4. P. 728–736.

54. Li L., Fernández-Cruz M., Connolly M., Schuster M., Navas J. Dissolution and aggregation of Cu nanoparticles in culture media: effects of incubation temperature and particles size // *J. Nanopart. Res.* 2015. Vol. 17. N 1: 38.

55. Fu L., Hamzeh M., Dodard S., Zhao Y., Sunahara G. Effects of TiO₂ nanoparticles on ROS production and growth inhibition using freshwater green algae pre-exposed to UV irradiation // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015. Vol. 39. N 3. P. 1074–1080.

56. Zhao J., Cao X., Liu X., Wang Z., Zhang C., White J.C., Xing B. Interactions of CuO nanoparticles with the algae *Chlorella pyrenoidosa*: adhesion, uptake, and toxicity // *Nanotoxicol.* 2016. Vol. 10. N 9. P. 1297–1305.

57. Wang Z., Zhang F., Vijver M.G., Peijnenburg W.J.G.M. Graphene nanoplatelets and reduced graphene oxide elevate the microalgal cytotoxicity of nano-zirconium oxide // *Chemosphere*. 2021. Vol. 276: 130015.

58. Zhao J., Cao X., Wang Z., Dai Y., Xing B. Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae // *Water Res.* 2017. Vol. 111. P. 18–27.

59. Tao X., Yu Y., Fortner J.D., He Y., Chen Y., Hughes J.B. Effects of aqueous stable fullerene nanocrystal (nC₆₀) on *Scenedesmus obliquus*: Evaluation of the sub-lethal photosynthetic responses and inhibition mechanism // *Chemosphere*. 2015. Vol. 122. P. 162–167.

60. Kwok K.W., Leung K.M., Flahaut E., Cheng J., Cheng S.H. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: influence of different dispersion methods // *Nanomedicine*. 2010. Vol. 5. N 6. P. 951–961.

61. Lukhele L.P., Mamba B.B., Musee N., Wepener V. Acute toxicity of double-walled carbon nanotubes to three aquatic organisms // *J. Nanomater.* 2015. Vol. 2015. N 3: 219074.

62. Fan W., Liu Y., Xu Z., Wang X., Li X., Luo S. The mechanism of chronic toxicity to *Daphnia magna* induced by graphene suspended in a water column // *Environ. Sci. Nano*. 2016. Vol. 3. N 6. P. 1405–1415.

63. Tervonen K., Waissi G., Petersen E.J., Akkanen J., Kukkonen J.V.K. Analysis of fullerene-C₆₀ and kinetic measurements for its accumulation and depuration in *Daphnia magna* // *Environ. Toxicol. Chem.* 2010. Vol. 29. N 5. P. 1072–1078.

64. De Marchi L., Neto V., Pretti C., Figueira E., Chiellini F., Morelli A., Soares A.M.V.M., Freitas R. Toxic effects of multi-walled carbon nanotubes on bivalves: Comparison between functionalized and nonfunctionalized nanoparticles // *Sci. Total Environ.* 2018. Vol. 622. P. 1532–1542.

65. Bangeppagari M., Park S.H., Kundapur R.R., Lee S.J. Graphene oxide induces cardiovascular defects in

- developing zebrafish (*Danio rerio*) embryo model: In-vivo toxicity assessment // *Sci. Total Environ.* 2019. Vol. 673. P. 810–820.
66. Prakash J., Venkatesan M., Sebastian Prakash J. J., Bharath G., Anwer S., Veluswamy P., Prema D., Venkataprasanna K.S., Venkatasubbu G.D. Investigations on the in-vivo toxicity analysis of reduced graphene oxide/TiO₂ nanocomposite in zebrafish embryo and larvae (*Danio rerio*) // *Appl. Surf. Sci.* 2019. Vol. 481. P. 1360–1369.
67. Souza J.P., Baretta J.F., Santos F., Paino I.M.M., Zucolotto V. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*) // *Aquat. Toxicol.* 2017. Vol. 186. P. 11–18.
68. Audira G., Lee J.-S., Siregar P., Malhotra N., Rolden M.J., Huang J.C., Chen K.H., Hsu H.S., Hsu Y., Ger T.R., Hsiao C.D. Comparison of the chronic toxicities of graphene and graphene oxide toward adult zebrafish by using biochemical and phenomic approaches // *Environ. Pollut.* 2021. Vol. 278: 116907.
69. Malakootian M., Yaseri M., Faraji M. Removal of antibiotics from aqueous solutions by nanoparticles: a systematic review and meta-analysis // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019. Vol. 26. N 9. P. 8444–8458.
70. Li M., Liu W., Slaveykova V.I. Effects of mixtures of engineered nanoparticles and metallic pollutants on aquatic organisms // *Environments.* 2020. Vol. 7. N 4: 27.
71. Tang Y., Li S., Qiao J., Wang H., Li L. Synergistic effects of nano-sized titanium dioxide and zinc on the photosynthetic capacity and survival of *Anabaena* sp. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. N 7. P. 14395–14407.
72. Wang D., Hu J., Irons D.R., Wang J. Synergistic toxic effect of nano-TiO and As(V) on *Ceriodaphnia dubia* // *Sci. Total Environ.* 2011. Vol. 409. N 7. P. 1351–1356.
73. Yang W.W., Li Y., Miao A.J., Yang L.Y. Cd²⁺ toxicity as affected by bare TiO₂ nanoparticles and their bulk counterpart // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012. Vol. 85. P. 44–51.
74. Hartmann N.B., Legros S., Von der Kammer F., Hofmann T., Baun A. The potential of TiO₂ nanoparticles as carriers for cadmium uptake in *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia magna* // *Aquat. Toxicol.* 2012. Vol. 118–119. P. 1–8.
75. Peterson J.W., Burkhardt R.S., Shaw D.C., Schuiling A.B., Haserodt M.J., Seymour M.D. Experimental determination of ampicillin adsorption to nanometer-size Al₂O₃ in water // *Chemosphere.* 2010. Vol. 80. N 11. P. 1268–1273.
76. Van Wieren E.M., Seymour M.D., Peterson J.W. Interaction of the fluoroquinolone antibiotic, ofloxacin, with titanium oxide nanoparticles in water: adsorption and breakdown // *Sci. Total Environ.* 2012. Vol. 441. P. 1–9.
77. Surwade P., Ghildyal C., Weikel C., Luxton T., Peloquin D., Fan X., Shah V. Augmented antibacterial activity of ampicillin with silver nanoparticles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *J. Antibiot.* 2019. Vol. 72. N 1. P. 50–53.
78. Abo-Shama U.H., El-Gendy H., Mousa W.S., Hamouda R.A., Yousuf W.E., Hetta H.F., Abdeen E.E. Synergistic and antagonistic effects of metal nanoparticles in combination with antibiotics against some reference strains of pathogenic microorganisms // *Infect. Drug. Resist.* 2020. Vol. 13. P. 351–362.
79. McShan D., Zhang Y., Deng H., Ray P.C., Yu H. Synergistic antibacterial effect of silver nanoparticles combined with ineffective antibiotics on drug resistant *Salmonella typhimurium* DT104 // *J. Environ. Sci. Health C: Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2015. Vol. 33. N 3. P. 369–384.
80. Windiasti G., Feng J., Ma L., Hu Y., Hakeem M.J., Amoako K., Delaquis P., Lu X. Investigating the synergistic antimicrobial effect of carvacrol and zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni* // *Food Control.* 2019. Vol. 96. P. 39–46.
81. Hwang I.-S., Hwang J.H., Choi H., Kim K.-J., Lee D.G. Synergistic effects between silver nanoparticles and antibiotics and the mechanisms involved // *J. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 61. N 12. P. 1719–1726.
82. Sun C., Li W., Xu Y., Hu N., Ma J., Cao W., Sun S., Hu C., Zhao Y., Huang Q. Effects of carbon nanotubes on the toxicities of copper, cadmium and zinc toward the freshwater microalgae *Scenedesmus obliquus* // *Aquat. Toxicol.* 2020. Vol. 224: 105504.
83. Freixa A., Acuña V., Sanchís J., Farré M., Barceló D., Sabater S. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms // *Sci. Total Environ.* 2018. Vol. 619. P. 328–337.
84. Wang X., Qu R., Liu J., Wei Z., Wang L., Yang S., Huang Q., Wang Z. Effect of different carbon nanotubes on cadmium toxicity to *Daphnia magna*: the role of catalyst impurities and adsorption capacity // *Environ. Pollut.* 2016. Vol. 208. P. 732–738.
85. Schwab F., Bucheli T.D., Camenzuli L., Magrez A., Knauer K., Sigg L., Nowack B. Diuron sorbed to carbon nanotubes exhibits enhanced toxicity to *Chlorella vulgaris* // *Environ. Sci. Technol.* 2013. Vol. 47. N 13. P. 7012–7019.
86. Jang M.-H., Hwang Y.S. Effects of functionalized multi-walled carbon nanotubes on toxicity and bioaccumulation of lead in *Daphnia magna* // *PLoS One.* 2018. Vol. 13. N 3: e0194935.
87. Zhang C., Chen X., Tan L., Wang J. Combined toxicities of copper nanoparticles with carbon nanotubes on marine microalgae *Skeletonema costatum* // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2018. Vol. 25. N 13. P. 13127–13133.
88. Song B., Xu P., Zeng G., Gong J., Wang X., Yan J., Wang S., Zhang P., Cao W., Ye S. Modeling the transport of sodium dodecyl benzene sulfonate in riverine sediment in the presence of multi-walled carbon nanotubes // *Water Res.* 2018. Vol. 129. P. 20–28.
89. Sun Y., Liu X., Lv X., Wang T., Xue B. Synthesis of novel lignosulfonate-modified graphene hydrogel for ultrahigh adsorption capacity of Cr(VI) from wastewater // *J. Clean. Prod.* 2021. Vol. 295: 126406.
90. Chenab K.K., Sohrabi B., Jafari A., Ramakrishna S. Water treatment: functional nanomaterials and applications from adsorption to photodegradation // *Mater. Today Chem.* 2020. Vol. 16: 100262.
91. Martín-de-Lucía I., Campos-Mañas M.C., Agüera A., Leganés F., Fernández-Piñas F., Rosal R. Combined toxicity of graphene oxide and wastewater to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Environ. Sci. Nano.* 2018. Vol. 5. P. 1729–1744.
92. Zhang X., Liu Y. Nanomaterials for radioactive wastewater decontamination // *Environ. Sci. Nano.* 2020. Vol. 7. N 4. P. 1008–1040.
93. Mubarak N.M., Sahu J.N., Abdullah E.C., Jayakumar N.S., Ganesan P. Microwave-assisted synthesis of multi-walled carbon nanotubes for enhanced removal of

Zn(II) from wastewater // Res. Chem. Intermed. 2016. Vol. 42. N 4. P. 3257–3281.

94. Miao A.-J., Luo Z., Chen C.-S., Chin W.-C., Santschi P.H., Quigg A. Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica* // PloS One. 2010. Vol. 5. N 12: e15196.

95. Mahana A., Guliy O.I., Mehta S.K. Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: current status and future challenges // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2021. Vol. 208: 111662.

96. Chen J., Li H., Han X., Wei X. Transmission and accumulation of nano-TiO₂ in a 2-step food chain (*Scenedesmus obliquus* to *Daphnia magna*) // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2015. Vol. 95. N 2. P. 145–149.

97. Mariano S., Panzarini E., Inverno M.D., Voulvoulis N., Dini L. Toxicity, Bioaccumulation and biotransformation of glucose-capped silver nanoparticles in green microalgae *Chlorella vulgaris* // Nanomaterials. 2020. Vol. 10. N 7: 1377.

98. Kalman J., Paul K., Khan F., Stone V., Fernandes T. Characterisation of bioaccumulation dynamics of three differently coated silver nanoparticles and aqueous silver in a simple freshwater food chain // Environ. Chem. 2015. Vol. 12. N 6. P. 662–672.

99. Ribeiro F., Gallego-Urrea J.A., Goodhead R.M., Van Gestel C.A., Moger J., Soares A.M., Loureiro S. Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by *Raphidocelis subcapitata*: The influence of silver behaviour in solution // Nanotoxicol. 2015. Vol. 9. N 6. P. 686–695.

100. Chen F., Xiao Z., Yue L., Wang J., Feng Y., Zhu X., Wang Z., Xing B. Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications // Environ. Sci. Nano. 2019. Vol. 6. N 4. P. 1026–1042.

101. Oh N., Park J.-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells // Int. J. Nanomed. 2014. Vol. 9. Suppl. 1. P. 51–63.

102. Wang S., Lv J., Ma J., Zhang, S. Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii* // Nanotoxicol. 2016. Vol. 10. N 8. P. 1129–1135.

103. Bakaraki Turan N., Sari H., Onkal Engin G., Bilgili M. Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity—a review // Process Saf. Environ. Prot. 2019. Vol. 130. P. 238–249.

104. Mortimer M., Petersen E.J., Buchholz B.A., Orias E., Holden P.A. Bioaccumulation of multiwall carbon nanotubes in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding or trophic transfer // Environ. Sci. Technol. 2016. Vol. 50. N 16. P. 8876–8885.

105. Allen B.L., Kichambare P.D., Gou P., Vlasova I.I., Kapralov A.A., Konduru N., Kagan V.E., Star A. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis // Nano Lett. 2008. Vol. 8. N 11. P. 3899–3903.

Поступила в редакцию 30.09.2021

После доработки 07.11.2021

Принята в печать 15.11.2021

REVIEW

Nanoparticles in the aquatic environment: the risks associated with them and the possibilities of their mitigation with microalgae

A.A. Gusev^{1, 2, 3} , O.V. Zakharova^{1, 2, 3} , I.A. Vasyukova¹ , N.A. Evtushenko⁴ ,
S.G. Vasilieva^{5, 6} , A.A. Lukyanov⁵ , E.S. Lobakova^{5, 6} ,
E.V. Skripnikova⁶, A.E. Solovchenko^{5, 6, *} 

¹Technopark “Derzhavinsky”, Derzhavin Tambov State University, Internatsionalnaya str. 33, Tambov, 392000, Russia;

²Department of Functional Nanosystems and High-Temperature Materials, National University of Science and Technology “MISIS”, Leninskii prosp. 4, Moscow, 119991, Russia;

³Engineering Center, Plekhanov Russian University of Economics, Stremiannii per. 36, Moscow 117997, Russia;

⁴Center for Forest Biotechnologies of the Directorate of Research Institute, Institute of Innovative Technologies of the Forestry Complex, Morozov Voronezh State University of Forestry and Technologies, Timiriazeva str. 8, Voronezh, 394087, Russia;

⁵Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁶Institute of Natural Sciences, Derzhavin Tambov State University, Internatsionalnaya str. 33, Tambov, 392000, Russia

*e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Nanoparticles (NPs) are dangerous micro-pollutants that exhibit biotoxicity even in low (nanogram range) concentrations. Apart from direct toxicity to living organisms, NPs can absorb and transfer organic or inorganic toxicants, as well as potentiate the toxicity of other micropollutants. Increasing use of NPs in the industrial and domestic applications leads to their increased production and discharge into the environment giving rise to diverse risks for ecosystems. These risks are exacerbated by the resilience of NPs to biodegradation in natural ecosystems and traditional wastewater treatment plants. Efficient NPs removal technologies are

complex and expensive, so they cannot be affordably replicated in common wastewater treatment plants. Despite the risks associated with NPs, humanity will not abandon their use in the nearest future, since the NPs are now at the foundation of many modern technologies. Biodestruction and biosorption of NPs using microalgae cultures and algal-bacterial consortia are considered promising approaches regarding the environmental safety and conservation of natural resources. However, the progress of this approach is hindered by paucity and fragmentary nature of the information about the effects of NPs on microalgae cells and microbial communities. This review attempts to fill this gap, at least partially, by considering common industrial NPs types based on metals and their oxides, as well as carbon nanomaterials. The pathways of their entry into aquatic ecosystems, toxicity to living organisms, accumulation and biotransformation in cells, synergistic effects of NPs in combination with heavy metals and antibiotics, as well as methods of bio-removal of NPs and nanomaterials from aquatic ecosystems using microalgae are discussed.

Keywords: *nanoparticles, microalgae, biotoxicity, bioremoval, wastewater, micropollutants*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 21-74-20004 (the part on metal-oxide and carbon nanoparticles) and Russian Foundation for Basic Research, project number 20-34-90115 (the part on metal nanoparticles).

Сведения об авторах

Гусев Александр Анатольевич – докт. биол. наук, директор НИИ экологии и биотехнологии Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина. Тел.: 8-4752-53-26-80 e-mail: nanosecurity@mail.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-8699-9112>

Захарова Ольга Владимировна – канд. биол. наук, зав. лабораторией Перспективных биотехнологий НИИ экологии и биотехнологии Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина. Тел.: 8-4752-53-26-80 e-mail: olgazakharova1@mail.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-8590-2529>

Васюкова Инна Анатольевна – канд. биол. наук, помощник директора НИИ нанотехнологии и наноматериалы Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина. Тел.: 8-4752-53-26-80 e-mail: vasyukovaia@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-6134-5702>

Евтушенко Надежда Александровна – мл. науч. сотр. лаборатории анализа ПЦР центра лесных биотехнологий и постгеномных технологий дирекции института инновационных технологий лесного комплекса Воронежского государственного лесотехнического университета имени Г.Ф. Морозова. Тел.: 8-473-253-78-47; e-mail: nadya.evtushenko.94@mail.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0003-0099-6779>

Васильева Светлана Геннадьевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: vankat2009@mail.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-9047-3922>

Лукьянов Александр Андреевич – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: lukyanov@mail.bio.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-2900-1053>

Лобакова Елена Сергеевна – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: elena.lobakova@mail.bio.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7054-0024>

Скрипникова Елена Владимировна – канд. биол. наук, директор Института естествознания Тамбовского государственного университета имени Г.Р. Державина. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena_sk@mail.ru

Соловченко Алексей Евгеньевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-6746-8511>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.21

Роль белка Nhr6 в разворачивании нуклеосом фактором FACT

А.Л. Сивкина^{1,*} , А.В. Феофанов^{1,2} , М.П. Кирпичников^{1,2} ,
М.С. Ахтар³, В.М. Студитский^{1,4} 

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

²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

³Отдел биохимии и структурной биологии, Центральный научно-исследовательский институт лекарственных средств, Индия, 226031, г. Лакхнау, Ситанур-роуд, Отделение Джанкипурама, сектор 10;

⁴Центр исследований рака Фокс Чейз, США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333
*e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com

Контролируемый доступ к ДНК в составе хроматина, необходимый для экспрессии генов, обеспечивается регуляторными факторами – такими, как белковый комплекс FACT. Как установлено ранее, дрожжевой FACT (уFACT) в присутствии белка Nhr6 осуществляет АТФ-независимое обратимое разворачивание нуклеосом, механизм которого требует детального изучения. В настоящей работе с целью изучения механизма разворачивания нуклеосом исследовано, достаточно ли одной молекулы Nhr6 для раскручивания нуклеосомной ДНК фактором уFACT или реорганизация структуры нуклеосомы требует совместного действия уFACT и нескольких молекул Nhr6. Исследования, проведенные методом электрофореза в нативных условиях, показали, что уFACT может связывать не менее трех молекул Nhr6. С помощью микроскопии одиночных частиц на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии установлено, что при увеличении соотношения уFACT:Nhr6 с 1:10 до 1:1 при постоянной концентрации Nhr6 способность уFACT разворачивать нуклеосомы не повышается, а снижается. Следовательно, для разворачивания нуклеосом необходимо связывание более одной молекулы Nhr6 в комплексе нуклеосома:уFACT:Nhr6. Полученные данные уточняют существующие представления о реорганизации структуры нуклеосом фактором уFACT.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, FACT, Spt16, Pob3, Nhr6

Ядро эукариотических организмов – это компартмент клетки, где расположен хроматин – сложный ДНК-белковый комплекс со многими уровнями структурной упаковки ДНК, которая осуществляется с помощью гистонов, а также других регуляторных и архитектурных белков. Функционально ремоделирование хроматина необходимо для предоставления доступа к ДНК ферментам, обеспечивающим транскрипцию.

Как правило, ремоделирующие хроматин белковые комплексы, к которым относятся семейства ISWI, CHD, SWI/SNF и INO80, являются АТФ-зависимыми [1]. Однако недавно был обнаружен уникальный АТФ-независимый ремоделер нуклеосом – дрожжевой шаперон гистонов FACT (уFACT) [2].

Белковые комплексы FACT дрожжей, человека и растений играют важную роль в поддержании и изменении структуры хроматина. Они вовлечены во многие клеточные процессы, такие как репликация, репарация и рекомбинация ДНК, транскрипция, поддержание функции центромер

и канцерогенез [3, 4]. FACT человека (hFACT) является одной из мишеней для антираковых препаратов [5–7].

hFACT и уFACT являются гетеродимерами. hFACT состоит из субъединиц Spt16 (suppressor of Ty16) и SSRP1 (structure specific recognition protein 1) [8]. уFACT состоит из двух белков – Spt16 и Pob3 (Pol 1 binding protein 3), но для его функциональной активности требуется ДНК-связывающий белок Nhr6 (Non histone protein 6) (рисунк, А). Установлено, что Nhr6 и уFACT по отдельности практически не влияют на структуру нуклеосом, однако при совместном воздействии обратимо разворачивают нуклеосомную ДНК без потери гистонов [2].

В настоящей работе с целью изучения механизма разворачивания нуклеосом исследовано, достаточно ли одной молекулы Nhr6 для раскручивания нуклеосомной ДНК фактором уFACT или реорганизация структуры нуклеосомы требует совместного действия уFACT и нескольких молекул Nhr6.

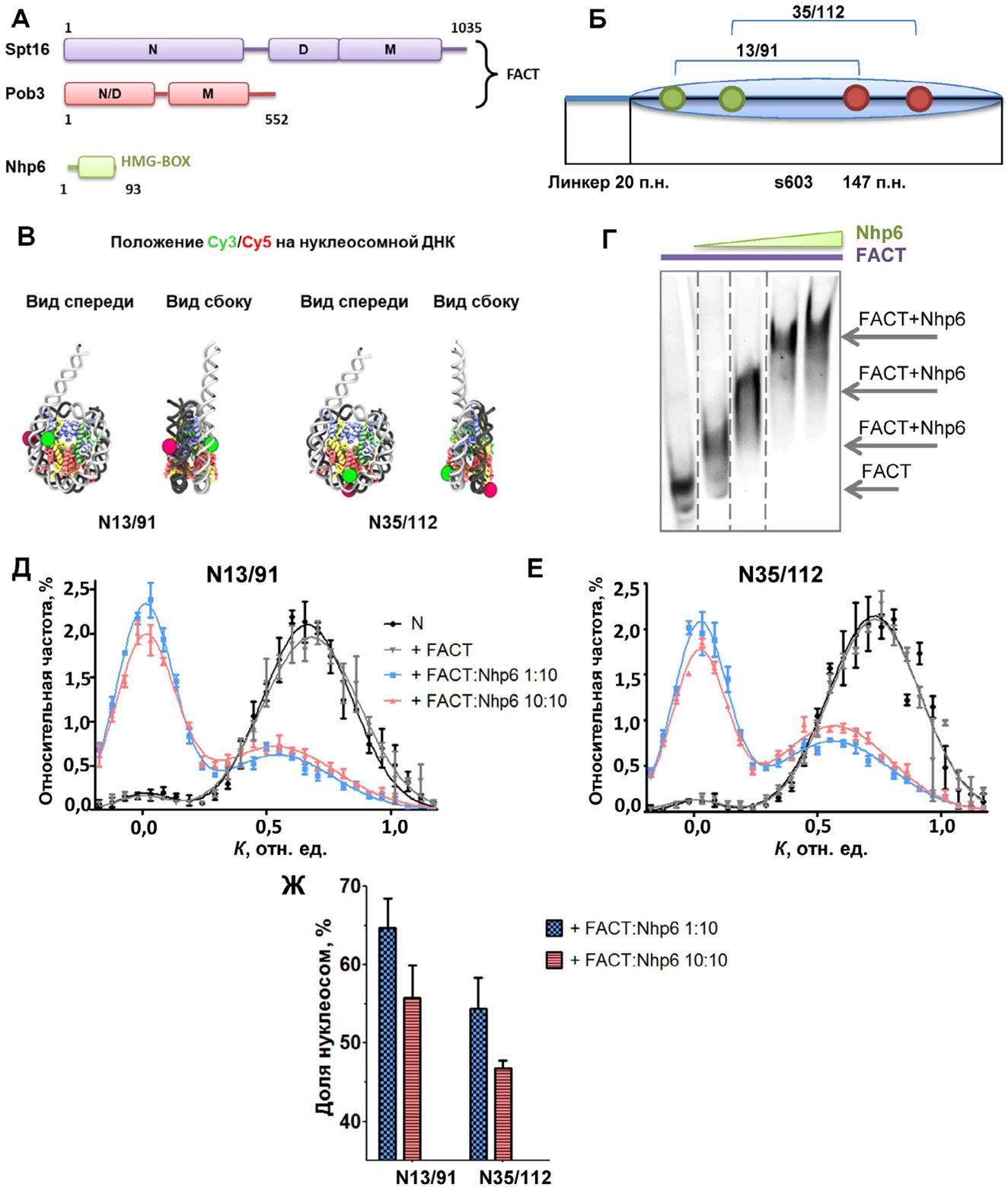


Рисунок. Определение эффективности разворачивания нуклеосом при различных соотношениях FACT:Nhp6. **(А)** Схема строения дрожжевого комплекса FACT и Nhp6. N – N-концевой домен, D – димеризационный домен, M – медиальный домен, N/D – N-концевой димеризационный домен, HMG-BOX – HMG-домен белка Nhp6. **(Б)** Схема ДНК-матрицы. Овал – положение нуклеосом-позиционирующей последовательности ДНК. Зеленые кружки – положения метки *Su3* на ДНК-матрице, красные кружки – положения метки *Su5*. **(В)** Схема структуры нуклеосом N13/91 и N35/112 с расположением меток *Su3* и *Su5*. **(Г)** Образование комплексов FACT:Nhp6 при различных концентрациях Nhp6 по данным электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрация FACT – 0,133 мкМ. Концентрация Nhp6 (слева направо) – 0,4, 0,67, 1,33, 2,67 мкМ. **(Д, Е)** Частотные распределения нуклеосом N13/91 и N35/112 по эффективности FRET (*K*) при различных молярных соотношениях FACT:Nhp6. Левый пик соответствует развернутым, а правый – интактным нуклеосомам. Профили усреднены по трем независимым измерениям. **(Ж)** Гистограммы относительного содержания развернутых нуклеосом (нуклеосом с низкой эффективностью FRET) в образцах N13/91 и N35/112 в комплексах с FACT и Nhp6 при различных молярных соотношениях FACT:Nhp6. Приведены средние значения ± ошибка среднего.

формы. Доли нуклеосом в различных состояниях оценивались как площади под соответствующими гауссовыми пиками, нормализованные на общую площадь под графиком.

Электрофорез комплексов уFACT с Nhr6. Белковый комплекс уFACT (0,133 мкМ) смешивали с Nhr6 в концентрации 0,4–2,66 мкМ, инкубировали 10 мин при 30 °С в буфере (17 мМ HEPES, 2 мМ Tris-HCl, 0,8 мМ Na₃EDTA, 0,11 мМ β-меркаптоэтанол, 150 мМ KCl, 11 мМ NaCl, 1,1% глицерина, 12% сахарозы). Пробы анализировали с помощью электрофореза в 4%-ном ПААГ с соотношением акриламида к бисакриlamиду 39:1 в нативных условиях (электродный буфер 0,5× TBE) при +4 °С. Гели окрашивали серебром по стандартной методике.

Результаты и обсуждение

При разворачивании нуклеосом белковым комплексом уFACT в реакции участвуют три компонента: нуклеосомы, уFACT и Nhr6. Известно, что уFACT не взаимодействует с нуклеосомой при отсутствии Nhr6 [2]. С использованием криоэлектронной микроскопии показано, что при образовании комплекса уFACT-Nhr6-нуклеосома уFACT связывается с нуклеосомой в соотношении 1:1 [12]. Установлено, что связывание Nhr6 с нуклеосомной ДНК происходит в области малой бороздки и не зависит от нуклеотидной последовательности, а количество молекул Nhr6 в комплексе с нуклеосомой может достигать восьми [13]. Было показано, что структурные перестройки в нуклеосоме в комплексе с уFACT, регистрируемые как увеличение расщепления нуклеосомной ДНК ДНКазой I, требуют десятикратного избытка Nhr6, но характер этих перестроек не был установлен и предполагается локальным [13]. В свою очередь масштабная реорганизация структуры нуклеосом под действием уFACT была обнаружена методом spFRET-микроскопии при молярном избытке Nhr6 и уFACT над нуклеосомами соответственно в 1300 и 130 раз [2]. Такой избыток белков по отношению к нуклеосомам был вызван, в первую очередь, необходимостью сместить равновесие в сторону образования комплексов при низкой концентрации нуклеосом (около 1 нМ), требуемой для измерения сигналов одиночных нуклеосом. Остается неясным, необходимы ли несколько молекул Nhr6 в комплексе с нуклеосомой для того, чтобы одна молекула уFACT, связываясь с таким комплексом, могла осуществить масштабную реорганизацию структуры нуклеосомы.

Для ответа на этот вопрос нами изучено взаимодействие уFACT с Nhr6 и проведено исследование влияния молярного соотношения уFACT:Nhr6 на реорганизацию структуры нуклеосом. Исследования проводили с использовани-

ем моонуклеосом с одним линкерным участком ДНК длиной 20 п.н., в которых флуоресцентные метки располагались на соседних супервитках нуклеосомной ДНК вблизи входа ДНК в нуклеосому (N13/91) или на большом расстоянии от входа/выхода ДНК из нуклеосомы (N35/112) (рисунок, Б, В). Положения меток были подобраны так, чтобы обеспечить эффективный FRET и не нарушить ДНК-гистоновые взаимодействия в нуклеосоме [2, 11].

Методом электрофореза в нативных условиях подтверждена обнаруженная ранее [13] способность Nhr6 образовывать комплексы с уFACT в растворе (рисунок, Г). Установлено, что подвижность образующихся комплексов уменьшается по мере увеличения молярного соотношения Nhr6:уFACT (рисунок, Г). Поскольку молекулярная масса Nhr6 (10 кДа) существенно меньше массы уFACT, то изменение подвижности уFACT в геле при присоединении Nhr6 обусловлено, скорее всего, изменением формы уFACT в комплексе и/или изменением заряда комплекса (Nhr6 – катионный белок, в гель при используемой полярности во время электрофореза не входит), а не возрастанием молекулярной массы комплекса.

Анализ зависимости положения полосы комплексов Nhr6 с уFACT на электрофореграмме от молярного соотношения белков позволяет предположить, что уFACT может связывать не менее трех молекул Nhr6. Если способность связываться с несколькими молекулами Nhr6 сохраняется и в составе комплекса уFACT с нуклеосомами, то это может быть важным условием для эффективной масштабной реорганизации структуры нуклеосом.

Согласно данным spFRET-микроскопии у свободных нуклеосом в растворе доминирует субпопуляция с высокой эффективностью FRET, т.е. с близким расположением соседних супервитков ДНК на октамере гистонов в области 13/91 и 35/112 п.н. (рисунок, Д, Е). В согласии с ранее полученными данными [2] уFACT в присутствии десятикратного избытка Nhr6 разворачивает нуклеосомы (рисунок, Д, Е). В это разворачивание вовлечена значительная часть нуклеосомной ДНК, поскольку структурные изменения происходят как вблизи входа ДНК в нуклеосому (рисунок, Д), так и вдали от него (рисунок, Е).

В условиях проведенных экспериментов образование комплексов нуклеосома: уFACT:Nhr6 при молярном соотношении уFACT:Nhr6 1:10 сопровождается появлением значительной субпопуляции нуклеосом с развернутой нуклеосомной ДНК (пик с максимумом $K \sim 0,0$; рисунок, Д, Е). Доли развернутых нуклеосом N13/91 и N35/112 в этом случае составляют 65% и 55% соответственно (рисунок, Ж).

При десятикратном увеличении концентрации уFACT в смеси с нуклеосомами и Nhp6 (т.е. при увеличении соотношения уFACT:Nhp6 до 1:1) обнаружено достоверное ($p < 0,05$) снижение доли развернутых нуклеосом N13/91 и N35/112 до 55% и 47% соответственно (рисунок, Д–Ж). Очевидно, что при таких условиях в растворе доминируют комплексы уFACT:Nhp6 стехиометрии 1:1, а число молекул Nhp6, связанных с одной нуклеосомой, снижается. Следовательно, одной молекулы Nhp6 в комплексе нуклеосома:уFACT:Nhp6 недостаточно для разворачивания нуклеосом, иначе наблюдалось бы увеличение доли развернутых нуклеосом, а не снижение. Снижение доли развернутых нуклеосом имеет ограниченный характер, что может объясняться более высокой аффинностью Nhp6 к нуклеосомам, чем к уFACT в растворе, позволяющей сохранить во многих комплексах необходимое для разворачивания количество молекул Nhp6.

Основные данные по реорганизации структуры нуклеосом фактором уFACT могут быть

суммированы следующим образом: 1) Nhp6 связывается с нуклеосомами [13], но не способен самостоятельно изменять их структуру [2]; 2) один белковый комплекс уFACT (т.е. один димер Spt16/Pob3) способен развернуть нуклеосому [12], но связывание уFACT с нуклеосомами невозможно в отсутствии Nhp6 [2]; 3) уFACT может взаимодействовать с несколькими молекулами Nhp6; 4) для разворачивания нуклеосом фактором уFACT требуется несколько молекул Nhp6 в комплексе нуклеосома:уFACT:Nhp6.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-44-02013) и при финансовой поддержке Департамента науки и технологии Индии (двусторонний проект № GAP0330). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clapier C.R., Iwasa J., Cairns B.R., Peterson C.L. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. Vol. 18. N 7. P. 407–422.
2. Valieva M.E., Armeev G.A., Kudryashova K.S., Gerasimova N.S., Shaytan A.K., Kulaeva O.I., McCullough L.L., Formosa T., Georgiev P.G., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Large-scale ATP-independent nucleosome unfolding by a histone chaperone // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. Vol. 23. N 12. P. 1111–1116.
3. Bondarenko M.T., Maluchenko N.V., Valieva M.E., Gerasimova N.S., Kulaeva O.I., Georgiev P.G., Studitsky V.M. Structure and function of histone chaperone FACT // *Mol. Biol.* 2015. Vol. 49. N 6. P. 796–809.
4. Gurova K., Chang H.W., Valieva M.E., Sandlesh P., Studitsky V.M. Structure and function of the histone chaperone FACT – Resolving FACTual issues // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2018. Vol. 1861. N 9. P. 892–904.
5. Chang H.W., Valieva M.E., Safina A., Chereji R.V., Wang J., Kulaeva O.I., Morozov A.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Gurova K.V., Studitsky V.M. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins // *Sci. Adv.* 2018. Vol. 4. N 11: aav2131.
6. Chang H.W., Nizovtseva E.V., Razin S.V., Formosa T., Gurova K.V., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT and curaxins: Effects on genome structure and function // *J. Cancer Metastasis Treat.* 2019. Vol. 5: 78.
7. Kantidze O.L., Luzhin A.V., Nizovtseva E.V., Safina A., Valieva M.E., Golov A.K., Velichko A.K., Lyubitelev A.V., Feofanov A.V., Gurova K.V., Studitsky V.M., Razin S.V. The anti-cancer drugs curaxins target spatial genome organization // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10. N 1: 1441.
8. Orphanides G., Wu W.H., Lane W.S., Hampsey M., Reinberg D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins // *Nature.* 1999. Vol. 400. N 6741. P. 284–288.
9. Thastrom A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom, J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 288. N 2. P. 213–229.
10. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Chromatin protocols. Methods in molecular biology methods (Methods and protocols)*, vol. 523 / Ed. S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2009. P. 109–123.
11. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Chromatin protocols. Methods in molecular biology*, vol. 1288 / Ed. S. Chellappan. N.Y.: Humana Press, 2015. P. 395–412.
12. Liu Y., Zhou K., Zhang N., Wei H., Tan Y.Z., Zhang Z., Carragher B., Potter C.S., D'Arcy S., Luger K. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome // *Nature.* 2020. Vol. 577. N 7790. P. 426–431.
13. Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form уFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. N 46. P. 45288–45295.

Поступила в редакцию 01.07.2021

После доработки 26.08.2021

Принята в печать 19.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Role of Nhp6 protein in nucleosome unfolding by factor FACT

A.L. Sivkina^{1,*} , A.V. Feofanov^{1,2} , M.P. Kirpichnikov^{1,2} ,
M.S. Akhtar³, V.M. Studitsky^{1,4} 

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

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, Moscow, 117997, Russia;*

³*Biochemistry and Structural Biology Division, CSIR–Central Drug Research Institute, Sector 10, Jankipuram Extension, Sitapur Road, Lucknow, PIN 226031, India;*

⁴*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Avenue, Philadelphia, PA 19111, USA*

*e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com

The accessibility of DNA is important for the regulation of gene expression and provided by regulatory factors, such as FACT protein complex. As it was shown before, in the presence of Nhp6 protein, yeast FACT (yFACT) induces ATP-independent reversible unfolding of nucleosome, but the detailed mechanism of this process is unknown. In this study, we investigated whether presence of single Nhp6 molecule is sufficient for the unwinding of nucleosomal DNA by the yFACT factor, or whether the reorganization of the nucleosome structure requires the combined action of yFACT and several Nhp6 molecules. Analysis of the protein complex in the absence of nucleosomes by native gel electrophoresis has shown that yFACT itself can bind at least three Nhp6 molecules. Using single particle microscopy based on the Foerster resonance energy transfer, it is shown that with an increase in the ratio yFACT:Nhp6 from 1:10 to 1:1 at a constant concentration of Nhp6, the ability of yFACT to unfold nucleosomes does not increase, but decreases. Therefore, the unfolding of the nucleosome requires the binding of more than one Nhp6 molecule in the complex nucleosome:yFACT:Nhp6. The obtained data clarify the existing model of the reorganization of nucleosome structure by yFACT.

Keywords: *chromatin, nucleosome, FACT, Spt16, Pob3, Nhp6*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation (project number №19-44-02013) and by the Department of Science and Technology, India (Bilateral Grant Project Code No. GAP0330).

Сведения об авторах

Сивкина Анастасия Львовна – аспирант, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4681-0178>

Феофанов Алексей Валерьевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Кирпичников Михаил Петрович – акад., проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8170-1607>

Ахтар Мохаммед Сохаил – Ph.D., гл. науч. сотр. отдела биохимии и структурной биологии Центрального научно-исследовательского института лекарственных средств (Лакхнау, Индия). Тел.: +91-522-277-2450; e-mail: sohail@cdri.res.in

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, проф. Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: +1-888-369-2427; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.22

Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикочувствительность *Escherichia coli*Л.Ю. Нестерова* , А.В. Ахова , А.Г. Ткаченко *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13***e-mail: larisa.nesterova@bk.ru*

Малые регуляторные молекулы, такие как индол и полиамины, вовлечены в регуляцию разнообразных процессов у бактерий, в том числе в защитный ответ на действие антибиотиков. Известно, что малые регуляторные молекулы могут оказывать влияние друг на друга, но информации о взаимовлиянии индола и полиаминов в литературе нет. В данной работе мы показали, что присутствие в среде культивирования микромолярных концентраций индола приводило к снижению чувствительности *Escherichia coli* к фторхинолоновым, бета-лактамам и аминогликозидным антибиотикам. Снижение чувствительности к антибактериальным препаратам штамма *E. coli*, способного к синтезу биогенных полиаминов, было более заметным, чем у дефицитного по путресцину и спермидину штамма. Экзогенный индол увеличивал внутриклеточное содержание путресцина и спермидина в 2 и 2,5 раза соответственно и не оказывал влияния на содержание кадаверина. Присутствие в среде полиаминов путресцина, кадаверина и спермидина, синтезируемых бактериями, не влияло на количество индола, продуцируемого *E. coli*. Добавка спермина, который синтезируется преимущественно эукариотами, увеличивала содержание индола в среде (не более чем на 20%). Полученные данные свидетельствуют о том, что индол снижает чувствительность *E. coli* к антибиотикам разных групп, обладающим различными механизмами действия. Одним из механизмов влияния индола на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам является стимуляция накопления в клетках биогенных полиаминов путресцина и спермидина.

Ключевые слова: индол, биогенные полиамины, антибиотикочувствительность, малые молекулы, сигнальные молекулы, *E. coli*

В последние годы все больше внимания уделяется исследованию малых молекул, которые продуцируются разными группами организмов и принимают участие в реализации многих жизненно важных функций. Среди них большой интерес вызывают метаболиты, участвующие в регуляции физиологических процессов в клетках, межклеточных взаимодействиях и выполняющие функции сигналов на внутри- и межвидовом уровне. Особое место среди таких соединений занимает индол — продукт расщепления аминокислоты триптофана, который в значительных количествах продуцируется различными организмами [1], включая многие виды грамположительных и грамотрицательных бактерий [2]. Индол играет существенную роль в таких аспектах жизнедеятельности бактерий, как регуляция клеточного цикла, индукция вирулентности, формирование биопленок, повышение устойчивости к действию кислот [3]. Кроме того, многочисленными исследованиями подтверждено участие индола в регуляции коллективных «поведенческих» реакций у бактерий, а также во взаимодействии макро- и микроорганизмов [1, 4, 5]. Значительное количество работ свидетельствует о том, что индол увеличивает резистент-

ность микроорганизмов к антибиотикам. В частности, показано, что он снижает чувствительность *Escherichia coli* к ампициллину, канамицину, норфлоксацину [6, 7] и *Vibrio splendidus* — к тетрациклину [8]. Сходное действие этого метаболита проявляется также в отношении тех бактерий, которые не являются его продуцентами, в частности *Salmonella typhimurium* [9]. Однако в более ранних исследованиях показана обратная связь между способностью продуцировать индол и антибиотикорезистентностью у *Klebsiella pneumoniae* [10]. Кроме того, в литературе имеются данные об обратном действии индола, в частности — об увеличении чувствительности бактерий родов *Lisobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* и *Xanthomonas* к ампициллину и канамицину в его присутствии [11]. Нет единого мнения и о роли индола в процессе формирования персистеров — субпопуляции бактериальных клеток, обладающих высокой физиологической толерантностью ко многим антибактериальным препаратам. С одной стороны, показано, что индол и его производные подавляют образование и активацию персистерных клеток [12, 13], с другой — есть данные о стимулирующем действии индола на их формирование [14]. Поми-

мо этого, показано взаимовлияние между индолом и другими малыми регуляторными молекулами, в частности аутоиндукторами системы Quorum sensing (QS) [3].

Среди других малых молекул-регуляторов метаболизма обращают на себя внимание биогенные полиамины. Эти алифатические поликатионы синтезируются из аминокислот и детектируются в клетках всех групп живых организмов. Бактериями и растениями продуцируются преимущественно путресцин, кадаверин и, в меньшем количестве, спермидин, в то время как в животных органах и тканях, помимо путресцина и спермидина, в значительных (миллимолярных) концентрациях содержится спермин [15]. Известна регуляторная роль полиаминов во многих клеточных процессах, таких как транскрипция, трансляция, репликация, транспортные процессы, клеточная пролиферация и др. [16]. У микроорганизмов полиамины участвуют в адаптации к стрессовым воздействиям посредством регуляции экспрессии адаптивных генов [17]. Ранее показано, что биогенные полиамины уменьшают чувствительность бактерий к антибиотикам с различными механизмами действия [18], а также могут влиять на функционирование системы QS у *Vibrio harveyi* [19].

Малые регуляторные молекулы могут оказывать взаимное влияние как на уровне синтеза, так и на уровне регуляции активности, создавая за счет этого сложную регуляторную сеть, которая обеспечивает оптимальный адаптивный ответ бактериальных клеток в неблагоприятных условиях, в том числе при действии антибактериальных препаратов. Однако о взаимодействии индола и полиаминов в доступной литературе данных нет.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение взаимного влияния индола и биогенных полиаминов на уровне биосинтеза, а также роли данного взаимодействия в ответе *E. coli* на действие антибактериальных препаратов.

Материалы и методы

Микроорганизмы и условия культивирования.

В качестве объектов исследования в работе использованы генетически модифицированные изогенные штаммы *E. coli* с полноценной системой синтеза полиаминов GGB2600 (MG1655 DlacIZ::Dfrit_ftpG::ptetAzeo-RBS1-TnluxKm) и неспособный синтезировать путресцин и спермидин SL60 (GGB2600 speAB::Spec speED::Cm speC::Tet), любезно предоставленные проф. Ж.-М. Гиго (Институт Пастера, Париж).

Перед экспериментом штаммы *E. coli*, сохраняемые на скошенном агаре LB (Sigma, США), высевали на бульон LB (Amresco, США), и культивировали в термостате при 37 °С. После суточного культивирования клетки переседали на бульон LB либо на синтетическую минеральную среду M9 с добавкой 0,4% глюкозы и культивиро-

вали при той же температуре. После 14–16 ч культивирования при 37 °С культуру использовали в качестве инокулята. В экспериментах с полиаминдефицитным штаммом на минеральной среде культуру предварительно истощали по полиамину тремя последовательными пересевами на среде M9. В экспериментах по определению продукции индола и накопления полиаминов инокулят разводили свежей средой LB (конечный объем 50 мл) до оптической плотности 0,1 и 0,3 соответственно и культивировали в колбах Эрленмейера (250 мл) в термостатируемом шейкере GFL-1092 (GFL, Германия) при температуре 37 °С с перемешиванием при 100 об./мин. Оптическую плотность бактериальных культур (ОП₆₀₀) измеряли по величине абсорбции при 600 нм с использованием спектрофотометра UV-1650PC (Shimadzu, Япония). Для экзогенных добавок использовали индол (Sigma, Китай) и гидрохлориды путресцина, кадаверина, спермидина и спермина (Sigma, Швейцария) в концентрациях, указанных на рисунках.

Определение антибиотикоустойчивости.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотиков определяли модифицированным методом двукратных серийных разведений (шаг между концентрациями составлял 1,25) в 96-луночных полистироловых планшетах (Минимед, Россия) на среде LB и M9. Культуру *E. coli* выращивали до ОП₆₀₀=1,0, разводили до ОП₆₀₀=0,1 и разводили ещё в 100 раз. В лунки планшета, содержащие 100 мкл питательной среды с антибиотиком и полиаминами, вносили 100 мкл инокулята. Культивировали 24 ч при 37 °С в статическом режиме. МПК считали минимальную концентрацию антибиотика, подавляющую видимый рост микроорганизмов.

Определение содержания внутриклеточных полиаминов. Концентрацию полиаминов определяли методом тонкослойной хроматографии их дансил-производных [20].

Количественное определение индола. Концентрацию индола в среде измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, предложенным Ким с соавт. [21], с небольшими модификациями. Хроматографическая система включала хроматограф LC-20A, оснащенный детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония), колонку Synergi Hydro-RP (150×4,6 мм, 4 мкм) (Phenomenex, США), предколонку SecurityGuard C18 (4×3 мм) (Phenomenex, США). Разделение проводили при 25 °С и скорости потока мобильной фазы 1 мл/мин в изократическом режиме. Мобильная фаза состояла из смеси ацетонитрила (Криохром, Россия) и уксусной кислоты (0,1% об.) в соотношении 1:1. Детектирование проводили при длине волны 280 нм. Для расчета концентрации индола применяли метод внешнего стандарта с использованием предварительно построенной калибровочной кривой.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США). Критерии оценки статистической значимости, количество независимых экспериментов (n) и вид представленных данных указаны в подписях к рисункам.

Результаты и обсуждение

Ранее показана способность как индола, так и полиаминов оказывать влияние на чувствительность бактерий к антибиотикам [6, 8, 18]. В то же время, индол, как сигнальная молекула, способен воздействовать на биосинтез и активность других регуляторных молекул [3]. Эти данные послужили основанием для исследования влияния индола на чувствительность к антибиотикам бактерий с разной способностью продуцировать полиамины. Установлено, что добавка индола в среду культивирования снижает чувствительность *E. coli* к антибиотикам трех разных классов с различными механизмами действия: фторхинолоны (левофлоксацин), бета-лактамы (цефотаксим), аминогликозиды (амикацин) (таблица). В присутствии индола наиболее заметно уменьшалась чувствительность к аминогликозидному антибиотику амикацину. Практически во всех случаях эффект

индола зависел от концентрации в среде и сильнее проявлялся при культивировании на глюкозо-минеральной среде М9, чем на бульоне LB (таблица). Вероятно, это вызвано тем, что на полноценной среде LB, содержащей большое количество аминокислот, в том числе предшественника индола триптофана, клетки продуцируют значительные количества эндогенного индола, что маскирует эффект экзогенных добавок этого соединения.

Следует отметить, что эффект индола сильнее проявлялся в отношении штамма *E.coli* GGB2600, способного к полноценному синтезу полиаминов, чем в отношении мутанта *E.coli* SL60, дефицитного по путресцину и спермидину (таблица). Исходя из этого мы предположили, что индол может оказывать влияние как сам по себе, так и посредством влияния на синтез полиаминов, которые, как было показано, снижают чувствительность к антибиотикам [18].

С целью изучения влияния индола на содержание полиаминов в клетке, *E. coli* выращивали в присутствии индола в близких к физиологическим (микромольных) концентрациях. Показано, что добавка индола в среду повышает содержание внутриклеточного путресцина к 8 ч культивирования приблизительно в 2 раза (рис. 1А), тогда

Таблица

Влияние индола на чувствительность *E. coli* штаммов GGB2600 и SL60 к антибиотикам

Среда	Индол (мкМ)	Минимальная подавляющая концентрация (мкг/мл)					
		Левифлоксацин		Цефотаксим		Амикацин	
		GGB2600	SL60	GGB2600	SL60	GGB2600	SL60
LB	0	0,036	0,024	0,060	0,042	4,68	4,68
	50	0,036	0,024	0,075	0,042	4,68	4,68
	100	0,045	0,024	0,075	0,052	5,85	5,85
	200	0,045	0,030	0,075	0,052	9,36	5,85
	500	0,045	0,036	0,090	0,063	8,19	5,85
M9	0	0,024	0,012	0,024	0,021	3,90	2,34
	50	0,030	0,012	0,036	0,026	4,88	2,34
	100	0,030	0,015	0,036	0,026	7,80	3,51
	200	0,042	0,015	0,036	0,026	9,75	3,51
	500	0,048	0,018	0,042	0,032	13,65	2,93

Примечание: в таблице приведены значения моды (3–8 независимых экспериментов)

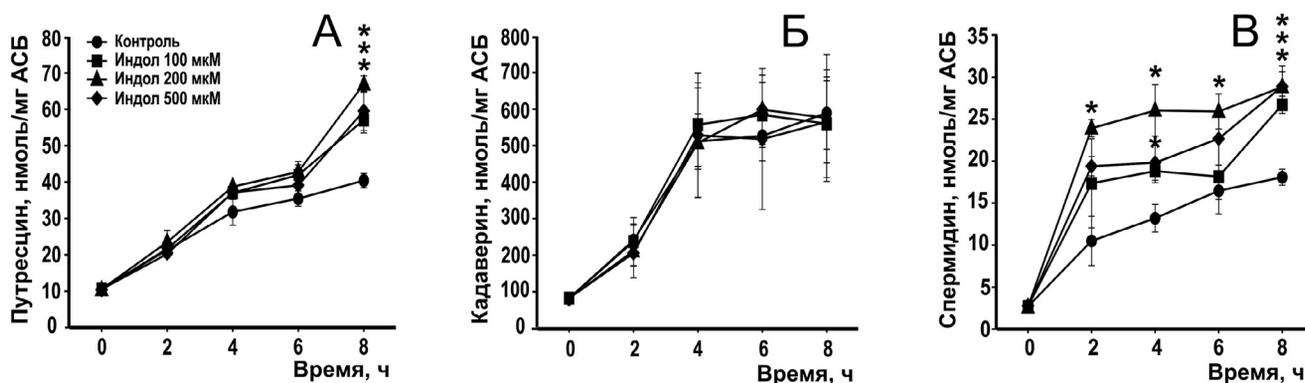


Рис. 1. Влияние индола на содержание полиаминов в клетках *E. coli* штамма GGB2600.

А – путресцин; Б – кадаверин; В – спермидин. Индол внесен в среду в точке 0 ч.

Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего (n=4)

* – статистически значимое отличие от контрольной культуры без добавок (t-критерий, p<0,05).

как уровень кадаверина остается неизменным (рис. 1Б). Наиболее значительно присутствие в среде индола сказывалось на содержании внутриклеточного спермидина, количество которого при добавке индола в концентрации 200 мкМ уже ко второму часу культивирования увеличивалось в 2,5 раза по сравнению с контролем. Статистически значимые различия в этом случае наблюдались для всех исследованных концентраций индола (рис. 1В).

Ранее нами было показано, что именно спермидин, который содержится в клетках *E. coli* в наименьшем количестве, оказывает наибольшее действие на чувствительность к антибиотикам всех трех исследованных классов: фторхинолоны, бета-лактамы и аминогликозиды [18], в то время как путресцин оказывает значительно меньшее влияние на этот параметр. Самый слабый эффект на чувствительность к разным антибактериальным препаратам наблюдался у кадаверина, увеличения накопления которого в присутствии индола не происходило.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что эффект индола на антибиотико-чувствительность, по крайней мере частично, опосредован его воздействием на метаболизм полиаминов.

Способность полиаминов оказывать влияние на многие аспекты клеточного метаболизма, в том числе – повышать активность аутоиндуктора системы QS у *Vibrio harveyi* [19], послужила основанием для изучения их воздействия на продукцию сигнальной молекулы индола клетками *E. coli*. Однако присутствие путресцина, спермидина и кадаверина не оказывало влияния на накопление индола в среде культивирования (данные не показаны). Заметный эффект наблюдался только в присутствии полиамина спермина. Статистиче-

ски значимое отличие было зафиксировано спустя 3,5 ч после добавки в среду этого полиамина в концентрации 1 мМ. Внесение спермина в концентрации 5 мМ снижало оптическую плотность культуры и параллельно задерживало накопление индола. Однако к 5 ч культивирования количество индола сравнивалось с этим показателем в контрольной культуре, при этом оптическая плотность культуры, растущей при данной концентрации спермина, оставалась ниже контрольной (рис. 2). Таким образом, из всех полиаминов только спермин оказывал стимулирующее действие на синтез индола в клетках *E. coli*, однако и в этом случае эффект не превышал 20%. Принимая во внимание то, что «бактериальные» полиамины путресцин, кадаверин и спермидин не оказывают влияния на накопление индола, а спермин не синтезируется клетками абсолютного большинства бактерий, в том числе *E. coli*, создается впечатление, что такая стимуляция вряд ли способна оказать существенное влияние на физиологию микроорганизмов. Однако, учитывая то, что спермин в больших количествах содержится в органах и тканях человека и животных, которые являются средой обитания паразитических и симбионтных микроорганизмов, нельзя полностью исключать механизм регуляции синтеза индола при участии этого полиамина в естественных условиях.

Среди механизмов влияния индола на чувствительность бактерий к антибиотикам описаны индукция экспрессии генов множественного лекарственного выброса (multidrug efflux pumps) и антиоксидантных ферментов, генов, определяющих коллективные «поведенческие» реакции и др. [8, 11, 22]. В свою очередь, полиамины способны снижать чувствительность микроорганизмов к антибиотикам, ограничивая их транспорт в клетку, оказывая протекторное действие в от-

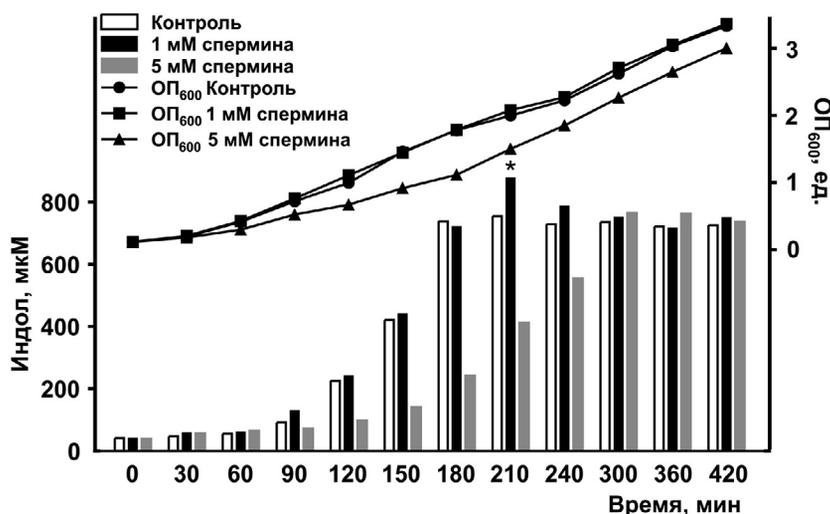


Рис. 2. Влияние спермина на накопление индола в культуре *E. coli* штамма GGB2600.

Спермин внесен в среду в точке 0 мин. Содержание индола: данные представлены в виде среднего ($n = 3$). Оптическая плотность: приведены данные типичного эксперимента из серии.

* – статистически значимое отличие от контрольной культуры без добавок (t-критерий, $p < 0,05$).

ношении ДНК, защищая клетку от действия активных форм кислорода, стимулируя биопленкообразование и др. [18, 23, 24]. Кроме того, описаны функции полиаминов как регуляторов экспрессии генов, объединенных в «полиаминовый модулон», многие из которых задействованы в адаптации к широкому ряду стрессовых воздействий [17, 18]. Помимо этого, продемонстрировано влияние биогенных полиаминов на формирование персистентных форм бактерий [25]. Таким образом, стимуляция накопления клетками полиаминов, и в первую очередь спермидина, может приводить к уменьшению чувствительности бактерий к антибиотикам.

Таким образом, подтверждено, что индол снижает чувствительность *E. coli* к антибиотикам

разных групп с различными механизмами действия. Показан ранее не описанный механизм влияния индола на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам посредством стимуляции накопления в клетках биогенных полиаминов путресцина и спермидина.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Жану-Марку Гиго (Институт Пастера, Париж) за предоставленные штаммы *E. coli*. Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290009-1. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomberlin J.K., Crippen T.L., Wu G., Griffin A.S., Wood T.K., Kilner R.M. Indole: an evolutionarily conserved influencer of behavior across kingdoms // *Bioessays*. 2017. Vol. 54. N 2. doi: 10.1002/bies.201600203.
2. El-Halfawy O.M., Valvano M.A. Non-genetic mechanisms communicating antibiotic resistance: rethinking strategies for antimicrobial drug design // *Expert Opin. Drug. Discov.* 2012. Vol. 7. N 10. P. 923–933.
3. Hu M., Zhang C., Mu Y., Shen Q., Feng Y. Indole affects biofilm formation in bacteria *Indian* // *J. Microbiol.* 2010. Vol. 50. N 4. P. 362–368.
4. Kim J., Park W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? // *J. Microbiol.* 2015. Vol. 53. N 7. P. 421–428.
5. Lee J.H., Wood T.K., Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule // *Trends Microbiol.* 2015. Vol. 23. N 11. P. 707–718.
6. Han T.H., Lee J.H., Cho M.H., Wood T.K., Lee J. Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli* // *Res. Microbiol.* 2011. Vol. 162. N 2. P. 108–116.
7. Lee H.H., Molla M.N., Cantor C.R., Collins J.J. Bacterial charity work leads to population-wide resistance // *Nature*. 2010. Vol. 467. N 7311. P. 82–85.
8. Zhang S., Shao Y., Zhao X., Li C., Guo M., Lv Z., Zhang W. Indole contributes to tetracycline resistance via the outer membrane protein OmpN in *Vibrio splendidus* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020. Vol. 36. N 3: 36.
9. Vega N.M., Allison K.R., Samuels A.N., Klempner M.S., Collins J.J. *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110. N 35. P. 14420–14425.
10. Kojo H., Asano J., Murakawa T., Nishida M. Antibiotic resistance of indole-positive *Klebsiella pneumoniae* // *Chemotherapy*. 1980. Vol. 26. N 6. P. 431–435.
11. Wang Y., Tian T., Zhang J., Jin X., Yue H., Zhang X-H., Du L., Bai F. Indole reverses intrinsic antibiotic resistance by activating a novel dual-function importer // *mBio*. 2019. Vol. 10. N 3: e00676-19.
12. Zhang W., Yamasaki R., Song S., Wood T.K. Interkingdom signal indole inhibits *Pseudomonas aeruginosa* persister cell waking // *J. Appl. Microbiol.* 2019. Vol. 127. N 6. P. 1768–1775.
13. Lee J.H., Kim Y.G., Gwon G., Wood T.K., Lee J. Halogenated indoles eradicate bacterial persister cells and biofilms // *AMB Express*. 2016. Vol. 6. N 1: 123.
14. Vega N.M., Allison K.R., Khalil A.S., Collins J.J. Signaling-mediated bacterial persister formation // *Nat. Chem. Biol.* 2012. Vol. 8. N 5. P. 431–433.
15. Michael A.J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. N 29. P. 14896–14903.
16. Gevrekci A.Ö. The roles of polyamines in microorganisms // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 33. N 11: 204.
17. Igarashi K., Kashiwagi K. Polyamine modulon in *Escherichia coli*: genes involved in the stimulation of cell growth by polyamines // *J. Biochem.* 2006. Vol. 139. N 1. P. 11–16.
18. Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Yu. Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics // *Res. Microbiol.* 2012. Vol. 163. N 2. P. 83–91.
19. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. Биогенные полиамины как модуляторы активности Quorum sensing системы и биопленкообразования *Vibrio harveyi* // *Вестн. Перм. ун-та*. 2019. № 3. С. 300–308.
20. Чудинов А.А., Чудинова Л.А., Коробов В.П. Метод определения низкомолекулярных олигоаминов в различном биологическом материале // *Вопр. мед. хим.* 1984. № 4. С. 127–132.
21. Kim D., Sitepu I.R., Hashidokoa Y. Induction of biofilm formation in the betaproteobacterium *Burkholderia unanatae* CK43B exposed to exogenous indole and gallic acid // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. Vol. 79. N 16. P. 4845–4852.
22. Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2005. Vol. 55. N 4. P. 1113–1126.

23. Delcour A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1794. N 5. P. 808–816.

24. Michael A.J. Polyamine function in archaea and bacteria // J. Biol. Chem. 2018 Vol. 293. N 48. P. 18693–18701.

25. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Karavaeva E.A., Shumkov M.S. Putrescine controls the formation of

Escherichia coli persister cells tolerant to aminoglycoside netilmicin // FEMS Microbiol. Lett. 2014. Vol. 361. N 1. P. 25–33.

Поступила в редакцию 16.06.2021

После доработки 22.07.2021

Принята в печать 10.09.2021

RESEARCH ARTICLE

Influence of indole on intracellular polyamines and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*

L.Y. Nesterova* , A.V. Akhova , A.G. Tkachenko 

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Golev st. 13, Perm, 614081, Russia

*e-mail: larisa.nesterova@bk.ru

Small regulatory molecules such as indole and polyamines are involved in the regulation of various processes in bacteria, including the response to antibiotics. It is known that small regulatory molecules can influence each other, but there is no information on the interaction of indole and polyamines. We have shown here that indole at micromolar concentrations reduces the susceptibility of *Escherichia coli* to fluoroquinolone, beta-lactam and aminoglycoside antibiotics. Indole had a stronger effect on the antibiotic susceptibility of bacteria capable of synthesizing the polyamines putrescine and spermidine as compared to a polyamine-deficient isogenic strain. Exogenous indole increased intracellular level of putrescine and spermidine by 2 and 2.5 folds, respectively, and had no effect on the cadaverine level. The supplementation of cultivation media with common bacterial polyamines, putrescine, cadaverine, and spermidine, did not influence the production of indole by *E. coli* cells. The addition of spermine, a polyamine mainly synthesized by eukaryotes, increased the release of indole into the medium by *E. coli* cells (by no more than 20%). Thus, indole reduces antibiotic susceptibility of *E. coli* to antibiotics with different mechanisms of antibacterial action, in particular, by increasing the amount of polyamines in bacterial cells.

Keywords: *indole, biogenic polyamines, antibiotic susceptibility, small molecules, signaling molecules, E. coli*

Funding: The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (AAAA-A19-119112290009-1).

Сведения об авторах

Нестерова Лариса Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории адаптации микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН». Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: larisa.nesterova@bk.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0003-2885-2777>

Ахова Анна Викторовна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории адаптации микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН». Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: akhovan@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-3477-750X>

Ткаченко Александр Георгиевич — докт. мед. наук, зав. лабораторией адаптации микроорганизмов «ИЭГМ УрО РАН – филиала ПФИЦ УрО РАН». Тел.: 8-342-212-2159; e-mail: agtkachenko@iegm.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8631-8583>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 574.34

**Токсическое влияние микрочастиц пластика
на культуру *Scenedesmus quadricauda*:
взаимодействие между микрочастицами пластика и водорослью****А.М. Лазарева^{1,*} , В.И. Ипатова¹ , О.В. Ильина¹ ,
Д.А. Тодоренко² , Д.Н. Маторин² , А.А. Байжуманов² **

¹Кафедра общей экологии и гидробиологии и ²кафедра биофизики, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
*e-mail: lazanna1998@mail.ru

В окружающей среде постоянно увеличивается количество частиц микропластика в результате распада пластиковых отходов, сжигание которых сопряжено с воздушными выбросами и концентрированием токсичных продуктов горения в зольных остатках. Изучению влияния микрочастиц пластика на живые объекты посвящено много работ, однако в литературе отсутствуют данные о его длительном токсическом действии, а также о действии продуктов сжигания пластика на фитопланктон. В настоящей работе исследовали влияние разных видов микрочастиц пластика и его золы на структурные и функциональные показатели роста культуры зеленой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* в длительных экспериментах продолжительностью 21 сут. Развитие вида изучали при добавлении в культуральную среду в концентрации 3 мг/л пяти образцов микрочастиц пластика полученных из пластика, отобранного на супралиторали Баренцева моря, и одного интактного образца, а также золы в концентрациях 0,01, 0,1, 1, 10, 100 и 1000 мг/л. По показателю изменения численности клеток *S. quadricauda* получили следующий ряд токсичности в порядке ее убывания: PU (монтажная пена) > HDPE (полиэтилен низкого давления, белый) > HDPE (полиэтилен низкого давления, красный) > EPS (пенополистирол) > EPS (пенополистерол, интактный) > PP (полипропилен, канат). По показателю эффективности фотосинтеза (максимального квантового выхода фотосинтеза (F_V/F_M)) монтажная пена оказалась нетоксичной, а другие образцы оказывали слабое токсическое действие. Влияние микрочастиц пластика на культуру вызывало мозаичную ответную реакцию, оцениваемую по разным показателям состояния тест-объекта: сильное угнетение роста культуры (при добавлении монтажной пены) может сопровождаться значительным повышением содержания ТБК-активных продуктов (продуктов взаимодействия конечных продуктов перекисного окисления липидов с 2-тиобарбитуровой кислотой) в клетках, при этом величина эффективности фотосинтеза не меняется. Токсичность зольного остатка, полученного при сжигании смеси разных видов пластика, была значительно выше токсичности исследованных образцов микрочастиц пластика, и выявлена по показателю изменения численности клеток только при концентрации 1000 мг/л, по показателю эффективности фотосинтеза – при 0,01 мг/л, а по изменению количества ТБК-активных продуктов в клетках водоросли – при 0,1 мг/л и выше.

Ключевые слова: микропластик, зола от сжигания пластика, биотестирование, микроводоросли, *Scenedesmus quadricauda*, флуоресценция хлорофилла

Пластиковый мусор попадает в природные системы, где он подвергается механической фрагментации, химической (окислительной и термической) деградации и биоразложению, способствующих постепенному превращению объемных полимеров в микро- и наночастицы пластмассы [1, 2]. Микронные и наноразмерные частицы пластика быстро и широко распространяются в морской среде, легко переносятся в океаны и на морское дно через пищевые сети и процессы агрегации, оказывая не-

благоприятное влияние на экосистемы [3]. Кроме того, микрочастицы пластика (МП) могут использоваться в качестве транспортного средства для трансграничного переноса микробных видов [4], эффективно адсорбировать стойкие органические загрязнители и неорганические загрязнения из-за их уникальных свойств – высокой площади поверхности и пористости [5], и в конечном итоге оказывать неблагоприятное воздействие на все организмы водных экосистем. Тем не менее, о токсич-

ческом воздействии МП на микроводоросли, которые являются одними из самых важных первичных продуцентов водных экосистем, известно немного.

МП мало влияет на рост микроводорослей [6]. Микро- и, в особенности, наночастицы пластика могут вызывать как торможение роста [7, 8], так и его стимуляцию [9]. В большинстве случаев не удалось найти значения полуэффективной концентрации $ЭК_{50}$ для МП из-за высоких концентраций, необходимых для индукции значительной токсичности.

Присутствие МП приводит к снижению у водорослей содержания хлорофилла [7, 10] и фотосинтетической активности [10, 11] независимо от задержки роста [7] и эффекта затенения [10], что, возможно, связано с уменьшением экспрессии генов фотосинтеза [12], увеличением потребности клеток в энергии для подвижности и нарушением газообмена из-за поверхностной адсорбции МП [13]. Более того, МП может препятствовать фотосинтезу, нарушая работу электронодонорного сайта и реакционного центра фотосистемы II (ФСII), снижая скорость переноса электронов, что приводит к образованию активных форм кислорода и окислительному стрессу [11, 13]. МП может вызывать морфологические изменения у микроводорослей [11], интернализироваться во время деления их клеток [14] или путем захвата миксотрофными организмами [15]. Он может накапливаться и в экзополимерных веществах, уменьшая доступность света, меняя биодоступность углерода, а также увеличивает частоту и силу вредоносного цветения водорослей из-за их способности использовать МП в качестве субстрата для роста [9, 11]. Из данных литературы пока не понятно, как свойства МП и адаптивные реакции разных видов микроводорослей влияют на токсичность разных типов МП.

На токсичность МП влияют ряд факторов, в том числе их концентрация в окружающей среде, тип полимера, размер, наличие добавок, химический состав и заряд. Как правило, более мелкие и положительно заряженные МП более токсичны для микроводорослей [13, 16]. Адсорбция загрязняющих веществ МП также может усиливать их воздействие [7].

Современные уровни МП в окружающей среде не оказывают значительного воздействия на микроводоросли [17]. Большинство испытанных концентраций МП в экспериментах, описанных в литературе, в значительной степени превосходят те, которые встречаются в окружающей среде; тем не менее, многие из этих исследований не показывают значительного воздействия этих полимеров на водоросли.

Таким образом, в литературе имеется весьма немногочисленные и неоднозначные сведения о влиянии МП на микроводоросли, полученные в основном в краткосрочных испытаниях.

Промышленное или стихийное сжигание пластиковых отходов является альтернативой его захоронению, однако оно сопряжено с воздушными выбросами и концентрированием токсичных продуктов горения в зольных остатках. Мусоросжигание не является распространенной практикой в России, однако в удаленных регионах с ограниченными возможностями обращения с твердыми коммунальными отходами попадание в водную среду продуктов сжигания пластика вследствие стихийной утилизации либо случайных возгораний является крайне вероятным.

В литературе описано образование высокотоксичных соединений в составе воздушных выбросов и зольного остатка, формирующихся при сжигании пластиковых отходов [18, 19], однако практически отсутствуют исследования, направленные на оценку токсичности продуктов горения пластика для водных организмов.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния разных видов МП и его золы на развитие тест-объекта — культуры зеленой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* — в длительных экспериментах.

Материалы и методы

Объект исследования. Тест-объектом исследования служила альгологически чистая культура зеленой хлорококковой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.).

Культуру выращивали на среде Успенского № 1 (состав, г/л: 0,025 KNO_3 ; 0,025 $MgSO_4$; 0,1 KH_2PO_4 ; 0,025 $Ca(NO_3)_2$; 0,0345 K_2CO_3 ; 0,002 $Fe_2(SO_4)_3$; pH 7,0–7,3) в люминостате при освещенности 3 клк со сменой дня и ночи (12:12 ч), температуре 22 ± 2 °C и перемешивании 2 раза в сут.

Развитие этого вида изучали в норме и при добавлении в среду в концентрации 3 мг/л пяти образцов МП, полученных из макрообразцов, отобранных на супралитерали Баренцева моря, и одного интактного образца, не подвергнувшегося атмосферному влиянию. Место отбора: Баренцево море, супралитераль (верхняя граница зимних штормов), материковая часть, напротив западной оконечности о. Кильдин. Дата отбора: 30.08.2020.

Виды исследуемых пластиков:

1. Expanded Polystyrene, EPS (материал — вспененный полистирол или пенополистирол). Происхождение — упаковочный пенопласт, собран на супралитерали. Размер частиц МП: $18,9 \pm 12,6$ мкм.

2. Polyurethane PU (материал — пенополиуретан). Происхождение — монтажная пена, собрана на супралитерали. Размер частиц МП: $76,7 \pm 18,9$ мкм.

3. High Density Polyethylene, HDPE, белый пищевой (материал — полиэтилен низкого давления, ПНД, или полиэтилен высокой плотности, ПВП). Происхождение — тара из-под молочных продук-

тов, собраны на супралиторали. Размер частиц МП: $208,3 \pm 72,3$ мкм.

4. HDPE красный пищевой. Происхождение – тара из-под пищевых продуктов, собрана на супралиторали. Размер частиц МП: 220 ± 74 мкм.

5. Polypropylene, PP (материал – полипропилен, ПП). Происхождение – судовой канат, собран на супралиторали. Диаметр волокон: $171,3 \pm 17,7$ мкм.

6. EPS интактный. Происхождение – упаковка от бытовой техники для лаборатории, атмосферному воздействию не подвергался. Год производства: 2019. Размер частиц МП: $130,2 \pm 35,9$ мкм.

Выбор концентрации 3 г/л образцов МП был обусловлен результатами предварительного опыта, показавшего отсутствие их токсичности для культуры *S. quadricauda* при 1 г/л.

Методы исследований. МП получали из макрообразцов, используя абразив и сито из нержавеющей стали с размером ячеек 300 мкм, затем микрочастицы пластика отделяли от остатков абразивного материала методом плотностной сепарации в дистиллированной воде и высушивали. Размеры частиц определяли на микрофотографиях с помощью программного обеспечения «КОМПАС-3D v14» (ЗАО «Аскон», Россия).

Действие золы, полученной при сжигании смеси МП, отобранных на супралиторали Баренцева моря, на культуру *S. quadricauda* оценивали в концентрациях 0,01, 0,1, 1, 10, 100 и 1000 мг/л. Зольный остаток получали при сжигании в печи типа Bullerjan (ЗАО «Лаотерм», Россия) при температуре около 400 °С смеси пластиков в соотношениях, близких к наблюдаемым на побережье Баренцева моря. Состав смеси пластиков для получения зольного остатка был следующим (массовая доля, %): PP (промышленная рыболовная сеть) – 24,2; PP (пленка пищевая) – 9,8; EPS крупнозернистый (пенопласт) – 6,1; EPS плотный (буй) – 14,4; PU (монтажная пена) – 2,4; LDPE (low density polyethylene; полиэтилен высокого давления, ПВД; пленка, пакеты) – 4,8; C/PAP (упаковка пищевая «тетрапак») – 4,6; HDPE (пищевые бутылки) – 8,4; HDPE (пленка, пакеты) – 2,8; HDPE (фрагменты канистры, ящиков и др. тары) – 22,5.

Опыты длительностью 21 сут проводили в конических колбах емкостью 100 мл, в которые добавляли 50 мл среды, в трех повторностях для каждого опытного образца МП, концентрации золы и контроля.

После добавления МП и золы в культуральную среду частицы EPS (интактный), EPS (пенополистирол), PU (монтажная пена), HDPE (белый), HDPE (красный) плавали на поверхности, частично оседали на дно колбы PP (полипропилен) и зола. А к концу эксперимента частично оседали все испытываемые материалы кроме EPS (интактный).

Основными структурными показателями для оценки состояния популяции служили изменение численности клеток (абсолютной и по сравнению

с контролем) в динамике ее развития. Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом.

Функциональное состояние клеток водоросли оценивали по флуоресценции хлорофилла, измеренной с помощью флуориметра AquaPen–C AP–C 100 (Photon System Instruments, Чехия). Флуоресценцию индуцировали красным светом с длиной волны 630 нм в течение 2 с при плотности потока квантов 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹. Перед измерениями пробы адаптировали к темноте в течение 10 мин. Величины интенсивности флуоресценции при 50 мкс (F_0) и 300 мс (F_M) использовали для определения максимального квантового выхода фотосинтеза ФСП как $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ [20].

Содержание ТБК-активных продуктов (продуктов взаимодействия конечных продуктов перекисного окисления липидов с 2-тиобарбитуровой кислотой) определяли согласно Стюарту и Бьюли [21] с небольшими модификациями. К 200 мкл суспензии клеток водоросли добавляли 1 мл раствора 0,25%-ной тиобарбитуровой кислоты в 10%-ной трихлоруксусной кислоте. Полученные пробы инкубировали в течение 30 мин при температуре 95 °С на водяной бане, после чего пробирки охлаждали 5 мин при температуре 0 °С. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об./мин. Поглощение измеряли при 532 нм и 600 нм. Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции 156 мМ⁻¹·см⁻¹.

Состав выбросов при сжигании смеси различных видов макропластика в печи определялся различными методами: свинец – методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICP-AES); CO и SO₂ – с помощью газоанализатора OPTIMA 7; хлористый водород (HCl) – турбидиметрическим методом; бенз[а]пирен – методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA Version 10 (StatSoft Inc., США). Данные в тексте и на рисунках представлены как «среднее ± доверительный интервал (2σ)». Нормальность распределения значений параметров оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок в экспериментах на водорослях проводили с использованием теста Стьюдента, считали различия значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В первой части работы были исследованы изменения различных параметров развития культуры на фоне действия МП. Все виды МП оказывали значимое влияние на рост культуры (рис. 1А). При этом значимое угнетение роста отмечено для

4 видов МП: для EPS (Баренцево море) на 30% на 3 сут, PU (монтажная пена) на 27–79% в течение всего опыта, HDPE (белый) на 41% на 3 сут, HDPE (красный) на 37% на 7 сут. А значимую стимуляцию наблюдали однократно для PP на 6% на 21 сут, для EPS (интактный) на 29% на 7 сут и для HDPE (белый) на 23–27% на 14 и 21 сут. В остальные сроки наблюдений численность клеток в присутствии шести видов МП находилась на уровне контроля.

Рост культуры при добавлении частиц МП каната находился на уровне контроля на протяжении всего хронического эксперимента длительностью 21 сут. А EPS (интактный) вызывал хотя и однократную, но довольно значительную и достоверную стимуляцию роста (на 29%), что может указывать на его слабую токсичность.

Таким образом, по показателю ингибирования роста водоросли самой токсичной оказалась монтажная пена PU, далее в порядке убывания токсичности были HDPE (белый), HDPE (красный) и EPS (Баренцево море). PP (канат) был нетоксичен.

Разницу в токсичности между пробой EPS, отобранной на супралиторали Баренцева моря, и EPS (интактный продукт) можно объяснить большей токсичностью первой пробы вследствие ее изменения в естественных условиях моря (окисление, адсорбция веществ). Продолжительная и значимая (в течение всего опыта) токсичность PU (монтажная пена) для исследуемого тест-объекта, вероятно, связана с высокой токсичностью ее органических компонентов и продуктов их окисления.

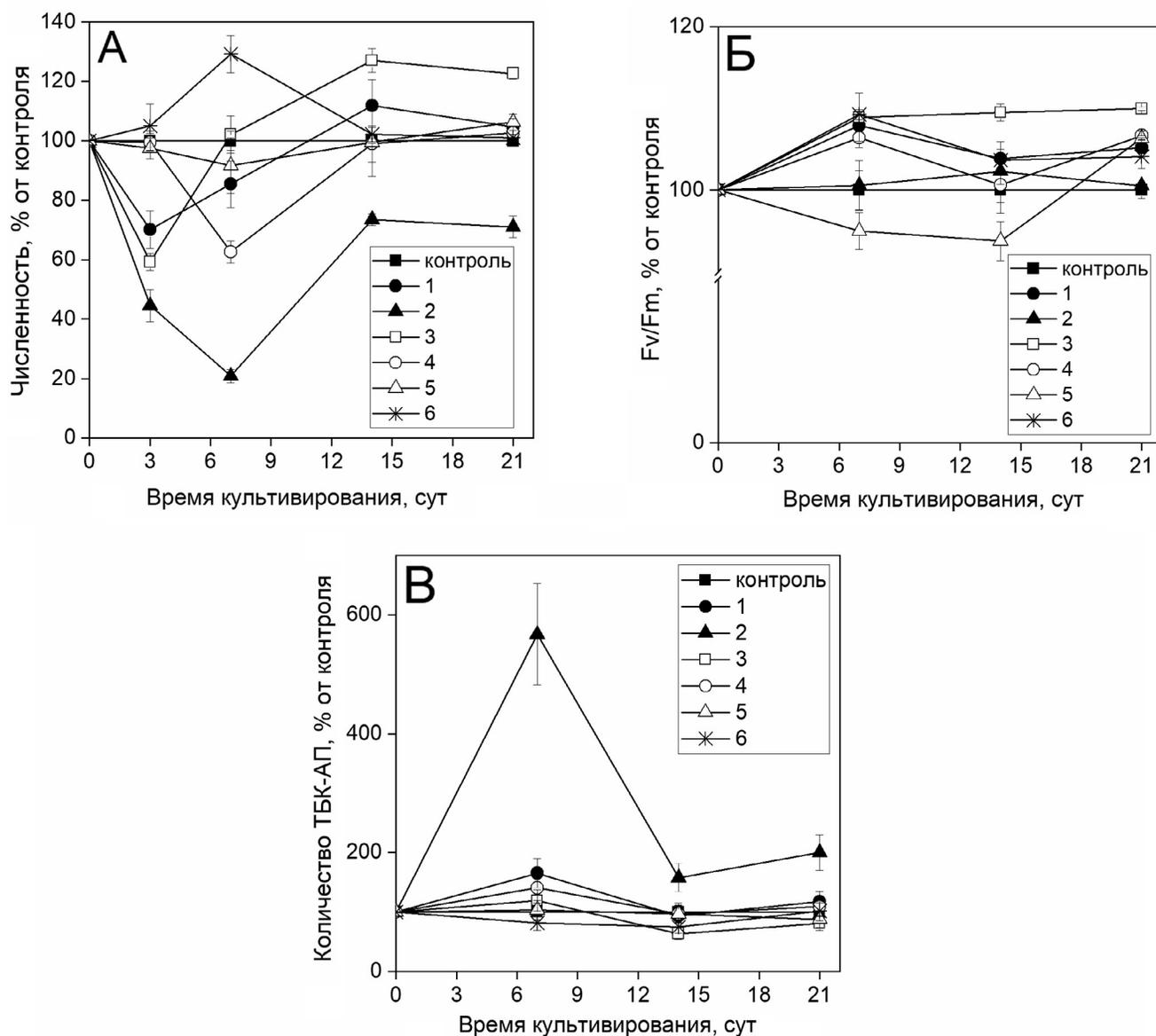


Рис. 1. Изменение численности клеток (А), максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_v/F_m) (Б) и количества ТБК-АП, % от контроля (В) *Scenedesmus quadricauda* (в % от контроля) в присутствии разных видов микропластика: 1 – EPS (Баренцево море); 2 – PU; 3 – HDPE белый; 4 – HDPE красный; 5 – PP; 6 – EPS (интактный).

Таким образом, по показателю изменения численности клеток *S. quadricauda* для пяти образцов МП, отобранных на супралиторали Баренцева моря, и одного интактного образца МП получили следующий ряд токсичности в порядке ее убывания:

PU > HDPE (белый) > HDPE (красный) > EPS > EPS (интактный) > PP.

В частицах МП могут содержаться токсичные химические вещества. Согласно литературным данным, химическая опасность пластикового загрязнения может быть связана как с компонентами, входящими в состав синтетических материалов [22], так и с токсичными соединениями, присутствующими в морской среде и сорбируемыми на поверхности пластиковых частиц [23]. К первой группе могут относиться мономеры, технологические добавки или побочные продукты производства, ко второй – стойкие органические загрязнители или тяжелые металлы. Токсичность МП зависит от размеров частиц, времени их пребывания в воде, характеристик биопленки, а также от химического состава частиц [24]. Так, полиэтилен, полипропилен и полистирол имеют достаточно высокие сорбционные свойства по ряду органических загрязнителей, при этом мономеры полиэтилена и полипропилена достаточно инертны по отношению к биологическим объектам [22], в то время как мономер полистирола – стирол – обладает острой токсичностью. Опасность монтажной пены связана, прежде всего, с выделением в окружающую среду высокотоксичных отвердителей – изоцианатов, присутствующих в ее составе. Возможно, токсическое действие исследованных нами образцов полиэтилена связано, в том числе, с сорбированными из воды соединениями, поскольку образцы пластика были собраны на акватории с интенсивным судоходством и соответствующей токсической нагрузкой в виде нефтепродуктов, горюче-смазочных материалов и др.

В настоящей работе в оценке токсичности исследуемых образцов МП были использованы не только структурные показатели состояния лабораторной популяции микроводоросли, но и функциональные показатели, характеризующие физиологическое состояние тест-объекта при токсическом воздействии.

Максимальный квантовый выход фотосинтеза ФСП (F_V/F_M) *S. quadricauda* при добавлении в культуральную среду исследуемых образцов МП на протяжении всего опыта изменялся незначительно – в пределах до 7% в сторону угнетения и до 10% в сторону стимуляции роста. Тем не менее, эти отличия оказались значимыми и носили продолжительный характер на протяжении всего опыта, что указывает на слабое токсическое действие большинства образцов на тест-культуру. Исключение составляла монтажная пена, в присутствии которой значения F_V/F_M были на уровне контроля (рис. 1Б).

Следовательно, все образцы МП, за исключением монтажной пены, оказывали слабое токсическое влияние на фотохимический квантовый выход – величину эффективности фотосинтеза (F_V/F_M). А монтажная пена по этому показателю оказалась нетоксичной.

Таким образом, вещества в составе монтажной пены вызывают продолжительное угнетение роста культуры и влияют на темп деления клеток, но величина эффективности фотосинтеза клеток остается в пределах нормы.

Окислительный стресс оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов в клетках, в состав которых входит ряд высокореакционных соединений, которые действуют на все компоненты клетки, включая ДНК, и приводят к дезорганизации мембранной структуры клеток.

Наблюдения за изменением количества ТБК-активных продуктов в клетках микроводоросли показали, что именно присутствие монтажной пены в среде культивирования приводит к образованию очень высокого уровня этих продуктов от 158 до 567% по отношению к контролю в течение всего опыта. В остальных случаях повышение было кратковременным (на 7 сут) для EPS (Баренцево море) и HDPE (красный) и величина этого показателя составляла соответственно 166 и 140% (рис. 1В).

Следовательно, влияние МП на культуру *S. quadricauda* носит неоднозначный характер и вызывает мозаичную ответную реакцию, оцениваемую по разным структурным и функциональным показателям состояния тест-объекта. А именно, сильное угнетение роста культуры может сопровождаться значительным повышением содержания ТБК-активных продуктов в клетках, при этом величина эффективности фотосинтеза не меняется.

Во второй части работы были исследованы изменения параметров развития культуры при действии зольного остатка, полученного от сжигания смеси макрочастиц пластика в весовых соотношениях, близких к наблюдаемым на супралиторали Баренцева моря. При всех концентрациях зольного остатка в широком интервале исследованных концентраций от 0,01 до 1000 мг/л значимого ингибирования роста тест-культуры обнаружено не было (рис. 2А). Значимая стимуляция на 16–19% отмечена только при самой высокой из всех концентраций 1000 мг/л на 14 и 21 сут. Такая стимуляция роста культуры может указывать на присутствие в золе компонентов, влияющих на темп деления клеток. Поэтому концентрации от 0,01 до 100 мг/л следует рассматривать как нетоксические, а концентрацию 1000 мг/л золы – как слабо-токсической.

Отсутствие выраженного токсического действия золы в интервале исследованных концентраций на изучаемую культуру по показателю численности клеток, по-видимому, связано с рядом причин. Во-первых, пластик на супралиторали

подвергается деградации и окислению. Это может приводить к образованию окисленных продуктов иной токсичности, чем у интактных, исходных образцов. Кроме того, при производстве пластиков используют токсичные добавки, такие как бисфенол А и фталаты, которые могли выделяться в окружающую среду в процессе деградации пластиков еще до их сжигания. Во-вторых, при сжигании пластика улетучиваются некоторые другие токсичные компоненты (например, диоксины и фураны). В-третьих, соотношение массовой доли разных видов пластика для получения золы показывает небольшой процент токсичной монтажной пены (2,4%), а большую часть пластикового мусора на супралитерали Баренцева моря составляет различная тара и рыболовные сети.

Изменение максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_V/F_M) *S. quadricauda* в присутствии разных концентраций золы было незначительным (рис. 2Б). Следует отметить, что при ма-

лых концентрациях золы 0,01–0,1 мг/л наблюдали значимое снижение этого показателя на 14%, при средних (1 и 10 мг/л) – только однократное (в одну из дат наблюдения) и более слабое значимое угнетение, а при высоких (100 и 1000 мг/л) – значимую стимуляцию на 18 %.

Обнаруженный нами эффект в литературе носит название «парадоксального», когда малые концентрации или уровни воздействия факторов оказывают большее негативное влияние, чем более высокие, и может проявляться при воздействиях различных факторов (металлы, антибиотики, ионизирующая радиация, пестициды и др.) [25–28].

По мнению разных авторов, в присутствии низких концентраций токсиканта в клетках его удерживается больше и меньше выводится из клеток, чем при более высоких концентрациях [28, 29]. Поскольку пластик в окружающей среде адсорбирует различные загрязняющие вещества и, в частности, токсичные металлы, то в золе могут

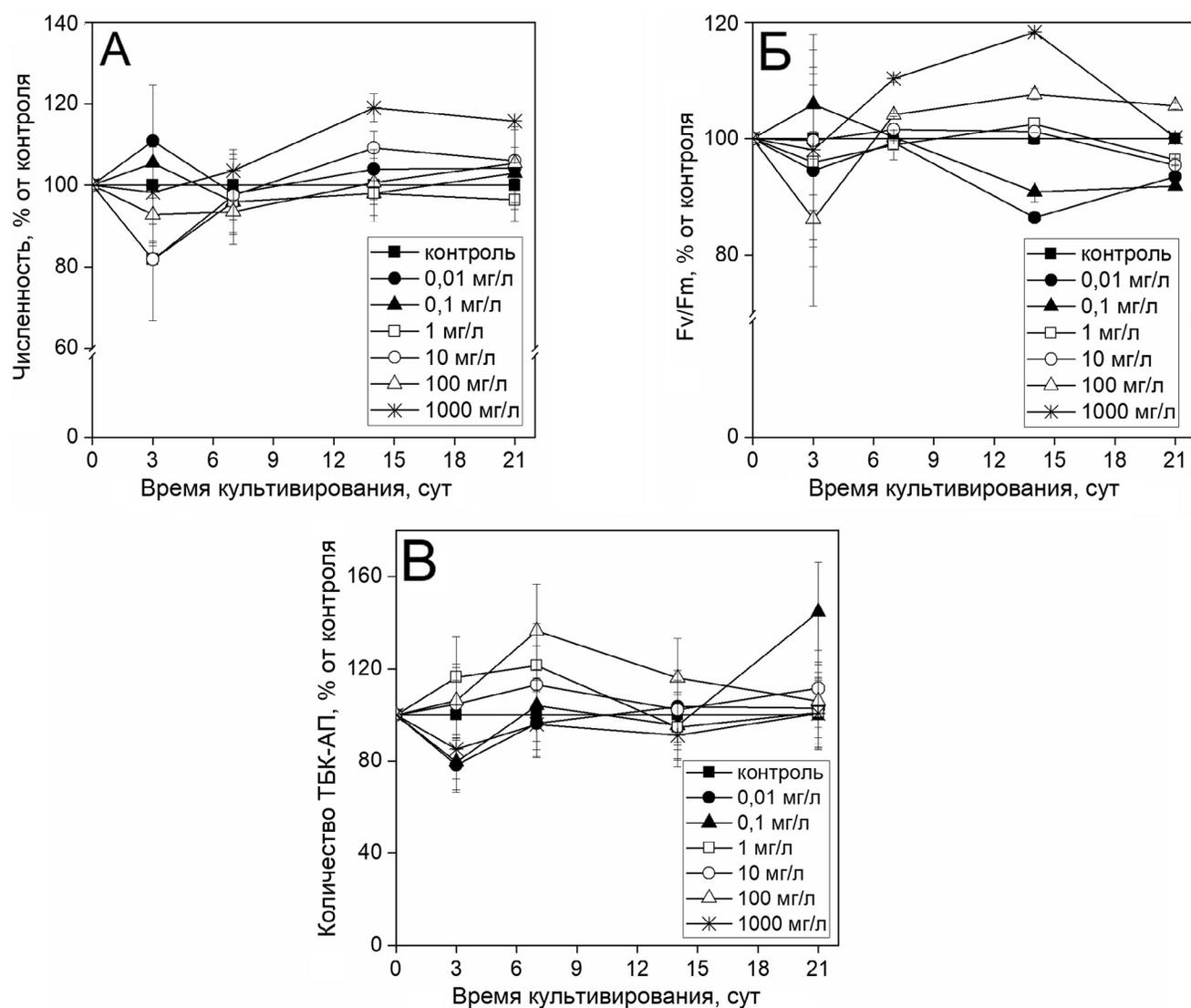


Рис. 2. Изменение численности клеток (А), максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_V/F_M) (Б) и количества ТБК-активных продуктов в клетках (В) *Scenedesmus quadricauda* (в % от контроля) в присутствии золы остатка смеси разных видов макропластика.

присутствовать их остаточные количества, которые затем накапливаются клетками и со временем могут вызывать токсический эффект. Поэтому угнетение эффективности фотосинтеза при добавках золы в концентрации 0,01 и 0,1 мг/л можно объяснить накопительным эффектом малых доз токсичных компонентов золы.

При сжигании разных видов пластика в составе золы часто обнаруживают – диоксины, бенз[а]-пирен и тяжелые металлы [18, 19]. Нами также были обнаружены в выбросах при сжигании в печи смеси исследованных видов пластика многие высокотоксичные летучие вещества, особенно бенз[а]-пирен ($0,74 \pm 0,19$ мкг/м³), СО (453 ± 32 ppm), SO₂ (77 ± 24 ppm), HCl ($4,39 \pm 1,10$ мг/м³), а также взвешенные вещества, в частности, тяжелый металл свинец ($0,091 \pm 0,023$ мг/м³).

Значительное увеличение количества ТБК-активных продуктов (более чем на 20% по сравнению с контролем) в клетках *S. quadricauda* в присутствии зольного остатка смеси разных видов пластика было выявлено однократно (только на один срок наблюдения) при концентрациях 0,1 мг/л (на 45% – на 21 сут), 1 мг/л (на 21% – на 7 сут) и 100 мг/л (на 37% – на 7 сут) золы (рис. 2В).

Таким образом, токсичность зольного остатка была выявлена по показателю изменения численности клеток только при максимальной испытанной концентрации в опыте (1000 мг/л), по показателю максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_v/F_m) – уже при минимальной (0,01 мг/л), а по изменению количества ТБК-активных продуктов в клетках – при 0,1 мг/л и выше.

Следовательно, зола была намного токсичнее исследованных видов МП, поскольку токсический эффект золы по показателю максимального квантового выхода фотосинтеза ФСII (F_v/F_m) обнаружен уже при 0,01 мг/л, по численности клеток – при 1 г/л, а для МП по разным показателям развития тест-культуры токсический эффект выявлен при 3 г/л.

Таким образом, наши исследования показали, что разные виды МП в концентрации 3 г/л негативно воздействуют на микроводоросли, подавляя рост, изменяя активность фотосинтеза и вызывая окислительный стресс в клетках. Сочетание разных структурных и функциональных показателей развития и состояния популяции клеток микроводоросли *S. quadricauda* в длительном эксперименте позволяет выявить токсический эффект золы, по-

лученной при сжигании смеси пластиков, при меньших токсических нагрузках и более адекватно давать оценку токсического действия исследуемого образца.

На основании анализа данных литературы можно заключить, что современные концентрации МП в окружающей водной среде, которые на несколько порядков ниже исследованных нами, по-видимому, не оказывают токсического действия на микроводоросли. Тем не менее, МП может нарушить популяцию микроводорослей за счет сокращения доступных питательных веществ, за счет подавления их первичных потребителей или выступая в качестве субстрата. Все эти изменения зависят от конкретных свойств МП, таких как тип полимера, размер и заряд поверхности, которые все еще недостаточно изучены. Даже небольшие изменения жизнедеятельности популяций микроводорослей как первичных продуцентов могут привести к серьезным нарушениям пищевой сети и последствиям для функционирования водных экосистем в целом.

Современные экспериментальные данные по токсичности МП не дают единого мнения в оценке их токсичности. Поэтому необходимы дальнейшие исследования самих свойств МП, их влияния на токсичность для микроводорослей, взаимодействия МП с другими веществами в окружающей среде, установление потенциальных основных механизмов их токсичности, а также выявления чувствительных видов водорослей и их адаптивных реакций, основанных на экологически значимых концентрациях.

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (темы: № 121032300131-9, № 121032500076-1) при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» и Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды», российского научного фонда (проект № 20-64-46018) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00465). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cau A., Avio C.G., Dessì C., Moccia D., Pusceddu A., Regoli F., Rita Cannas R., Follesa M.C. Benthic crustacean digestion can modulate the environmental fate of microplastics in the deep sea // Environ. Sci. Technol. 2020. Vol. 54. N 8. P. 4886–4892.

2. Debroas D., Mone A., Ter Halle A. Plastics in the North Atlantic garbage patch: a boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders // Sci. Total Environ. 2019. Vol. 599–600. P. 1222–1232.

3. Michels J., Stippkugel A., Lenz M., Wirtz K., Engel A. Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with

marine biogenic particles // Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci. 2018. Vol. 285. N 1885: 20181203.

4. Rosato A., Barone M., Negroni A., Brigidi P., Fava F., Xu P., Candela M., Zanaroli G. Microbial colonization of different microplastic types and biotransformation of sorbed PCBs by a marine anaerobic bacterial community // Sci. Total Environ. 2020. Vol. 705: 135790.

5. Alimi O.S., Farner Budarz J., Hernandez L.M., Tufenkji N. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport // Environ. Sci. Technol. 2018. Vol. 52. N 4. P. 1704–1724.

6. Prata J.C., da Costa J.P., Lopes I., Duarte A.C., Rocha-Santos T. Effects of microplastics on microalgae populations: A critical review // Sci. Total Environ. 2019. Vol. 665. P. 400–405.

7. Besseling E., Wang B., Lüring M., Koelmans A.A. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna* // Environ. Sci. Technol. 2014. Vol. 48. N 20. P. 12336–12343.

8. Bergami E., Pughalini S., Vannuccini M.L., Manfra L., Faleri C., Savorelli F., Dawson K.A., Corsi I. Long-term toxicity of surface-charged polystyrene nanoplastics to marine planktonic species *Dunaliella tertiolecta* and *Artemia franciscana* // Aquat. Toxicol. 2017. Vol. 189. P. 159–169.

9. Yokota K., Waterfield H., Hastings C., Davidson E., Kwietniewski E., Wells B. Finding the missing piece of the aquatic plastic pollution puzzle: interaction between primary producers and microplastics // Limnol. Oceanogr. Lett. 2017. Vol. 2. N 4. P. 91–104.

10. Zhang C., Chen X., Wang J., Tan L. Toxic effects of microplastics on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastics and algae // Environ. Pollut. 2017. Vol. 220. Pt. B. P. 1282–1288.

11. Mao Y., Ai H., Chen Y., Zhang Z., Zeng P., Kang L., Li W., Gu W., He Q., Li H. Phytoplankton response to polystyrene microplastics: perspective from an entire growth period // Chemosphere. 2018. Vol. 208. P. 59–68.

12. Lagarde F., Oliver O., Zanella M., Daniel P., Hiard S., Caruso A. Microplastic interactions with freshwater microalgae: hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type // Environ. Pollut. 2016. Vol. 215. P. 331–339.

13. Bhattacharya P., Lin S., Turner J.P., Ke P.C. Physical adsorption of charges plastic nanoparticles affect algal photosynthesis // J. Phys. Chem. 2010. Vol. 114. N 39. P. 16556–16561.

14. Chae Y., Kim D., Kim S.W., An Y.J. Trophic transfer and individual impact of nanosized polystyrene in a four-species freshwater food chain // Sci. Rep. 2018. Vol. 8: 284.

15. Long M., Paul-Pont I., Hégaret H., Moriceau B., Lambert C., Huvet A., Soudant P. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation // Environ. Pollut. 2017. Vol. 228. P. 454–463.

16. Nolte T.M., Hartmann N.B., Kleijn J.M., Garnæs J., van de Meent D., Hendriks A.J., Baun A. The toxicity of plastic nanoparticles to green algae as influenced by surface modification, medium hardness and cellular adsorption // Aquat. Toxicol. 2017. Vol. 183. P. 11–20.

17. Suaria G., Avio C.G., Mineo A., Lattin G.L., Magaldi M.G., Belmonte G., Moore C.J., Regoli R., Aliani S. The Mediterranean plastic soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters // Sci. Rep. 2016. Vol. 6: 37551.

18. Nakao T., Aozasa O., Ohta S., Miyata H. Formation of toxic chemicals including dioxin-related compounds by combustion from a small home waste incinerator // Chemosphere. 2006. Vol. 62. N 3. P. 459–468.

19. Valavanidis A., Iliopoulos N., Gotsis G., Fiotakis K. Persistent free radicals, heavy metals and PAHs generated in particulate soot emissions and residue ash from controlled combustion of common types of plastic // J. Hazard. Mater. 2008. Vol. 156. N 1–3. P. 277–284.

20. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivasta A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient // Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19 / Eds. G. Papageorgiou and R. Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 321–362.

21. Stewart R.R.C., Bewley J.D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. N 2. P. 245–248.

22. Lithner D., Larsson A., Dave G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition // Sci. Total Environ. 2011. Vol. 409. N 18. P. 3309–3324.

23. Ogata Y., Takada H., Mizukawa K., et al. International pellet watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs // Mar. Pollut. Bull. 2009. Vol. 58. N 10. P. 1437–1446.

24. Rochman C.M. The complex mixture, fate and toxicity of chemicals associated with plastic debris in the marine environment // Marine anthropogenic litter / Eds. M. Bergmann, L. Gutow, and M. Klages. Springer, 2015. P. 117–140.

25. Prokhotskaya V.Yu., Veselovski V.A., Veselova T.V., Dmitrieva A.G., Artyukhova V.I. On the nature of the three-phase response of *Scenedesmus quadricauda* populations to the action of imazalil sulfate // Russ. J. Plant Physiol. 2000. Vol. 47. N 6. P. 772–778.

26. Подколзин А.А., Гуревич К.Г. Действие биологически активных веществ в малых дозах. М.: КМК, 2002. 170 с.

27. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Сверхслабые воздействия химических соединений и физических факторов на биологические системы // Биофизика. 2004. Т. 49. № 3. С. 551–564.

28. Дмитриева А.Г., Ипатова (Артюхова) В.И., Кожанова О.Н., Дронина Н.Л., Желтухин Г.О., Крупина М.В. Реакция *Elodea canadensis* на загрязнение хромом среды обитания // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2006. № 2. С. 17–24.

29. Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф., Дрозденко Т.В. О некоторых особенностях физиологической гетерогенности популяции *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. в присутствии низких концентраций металлов // Токсикол. вестн. 2018. № 2. С. 34–43.

Поступила в редакцию 15.06.2021

После доработки 04.09.2021

Принята в печать 12.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Toxic effects of microplastics on culture *Scenedesmus quadricauda*: interactions between microplastics and algae**A.M. Lazareva^{1,*} , V.I. Ipatova¹ , O.V. Il'ina¹ ,
D.A. Todorenko² , D.N. Matorin² , A.A. Baizhumanov² **¹*Department of General Ecology and Hydrobiology and* ²*Department of Biophysics, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1–12, 119234, Moscow, Russia***e-mail: lazanna1998@mail.ru*

The number of microplastic particles (MPs) in the environment is constantly increasing as a result of the decay of plastic waste, the incineration of which is associated with air emissions and the concentration of toxic combustion products in ash residues. Although numerous researchers have studied the effects of MPs on living organisms, only a small part of the published data is devoted to the study of the long-term toxic effects of MPs and combustion products of plastic on phytoplankton organisms. The effect of different types of MPs and plastic incineration ash on the structural and functional growth parameters of a green microalga *Scenedesmus quadricauda* culture, used as a test object, was studied in a chronic experiment lasting 21 days. The development of the species was studied with the addition of 5 types of weathered MPs samples, obtained from macroplastics, collected in the supralittoral of the Barents Sea and one unweathered control sample at a concentration of 3 mg/L. In terms of changes in the number of *Scenedesmus quadricauda* cells, the following toxicity series was obtained in descending order: PU (polyurethane foam, weathered) > HDPE (food package, white, weathered) > HDPE (food package, red, weathered) > EPS (packaging material, weathered) > EPS (packaging material, unweathered) > PP (ship rope, weathered). In terms of the efficiency of photosynthesis (maximum quantum yield of PSII photochemistry (F_V/F_M)), polyurethane foam was found to be non-toxic, while other samples of MPs had a weak toxic effect. The effect of MPs on the culture caused a mosaic response, assessed by different parameters of the test object state: a strong inhibition of culture growth (with the addition of polyurethane foam) can be accompanied by a significant increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in microalgal cells, while photosynthesis efficiency may not change. The toxicity of the residual ash obtained from the incineration of a mixture of weathered macroplastics was significantly higher than the toxicity of microplastics. Residual ash was studied at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 mg/L and the toxicity was detected in terms of the change in the cell number only at a concentration of 1000 mg/L, in terms of the photosynthesis efficiency – at 0.01 mg/L, and by the change in the amount of TBARS in microalgal cells – at 0.1 mg/L and above.

Keywords: *microplastic, plastic incineration ash, bioassay, microalgae, Scenedesmus quadricauda, chlorophyll fluorescence*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032300131-9, project number 121032500076-1, and funded by Russian the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University «Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology», by Russian the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University «The future of the planet and global environmental change», Russian Science Foundation, project number 20-64-46018 and Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-00465.

Сведения об авторах

Лазарева Анна Максимовна – аспирант кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: *lazanna1998@mail.ru*; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-5596-5593>

Ипатова Валентина Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: *ipatova@mail.bio.msu.ru*, *viipatova@hotmail.com*; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7035-6913>

Ильина Олеся Васильевна – инженер кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: *ulesya@gmail.com*; ORCID <http://orcid.org/0000-0003-0273-7180>

Тодоренко Дарья Алексеевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: *todorenko@mail.bio.msu.ru*, *dariatodor@mail.ru*; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7344-0256>

Маторин Дмитрий Николаевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: *matorin@biophys.msu.ru*, *dnmatorin@mail.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6164-5625>

Байжуманов Адиль Ануарович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: *adilbayzhumanov@biophys.msu.ru*; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9737-4516>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

Особенности использования 2,6-дихлорофенолиндофенола в качестве акцептора электронов в исследованиях фотосинтеза**А.В. Локтюшкин* , Е.Р. Ловягина , Б.К. Семин ***Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: allokt@gmail.com*

2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ) – редокс-индикатор, широко используемый для исследования реакций переноса электрона в биологических системах, в том числе в процессе фотосинтеза. При восстановлении ДХФИФ, поглощающий свет в видимой области, обесцвечивается. ДХФИФ существует в растворе в двух формах – «розовой» и «синей», которые переходят друг в друга при протонировании/депротонировании. Нами исследована рН-зависимость скорости восстановления ДХФИФ фотосистемой 2 (ФС2) при двух длинах волн – 522 нм (изобестическая точка ДХФИФ) и 600 нм (вблизи максимума поглощения депротонированной «синей» формы). Показано, что при изменении рН среды измерения на длине волн 600 нм требуют внесения поправок, связанных с изменением соотношения «синей» и «розовой» форм акцептора, а также использования для расчета скорости восстановления ДХФИФ параметра рК этого акцептора, значения которого варьируют в различных источниках. Измерения в изобестической точке (522 нм) позволяют избежать этих сложностей. Также нами установлено, что максимум на рН-зависимости скорости восстановления ДХФИФ ФС2 сдвинут примерно на одну единицу в кислую область относительно максимума рН-зависимости скорости восстановления акцепторной пары 2,6-дихлоро-*n*-бензохинон – феррицианид калия. Этот сдвиг может быть связан с меньшей доступностью Q_B -сайта на акцепторной стороне ФС2 для заряженной депротонированной формы ДХФИФ по сравнению с незаряженной протонированной формой.

Ключевые слова: 2,6-дихлорофенолиндофенол, фотосистема 2, рН-зависимость, акцепторы электронов, 2,6-дихлоро-*n*-бензохинон, феррицианид калия, фотометрия

Скорость выделения кислорода и скорость восстановления искусственных акцепторов электронов являются интегральными показателями функциональной активности фотосинтезирующих кислород-выделяющих объектов [1]. В исследованиях мембранных препаратов фотосистемы 2 (ФС2) или тилакоидных мембран выделение кислорода регистрируется полярографически с помощью электрода Кларка и искусственных акцепторов электронов типа производных бензохинона, феррицианида и других соединений. Восстановление окрашенных искусственных акцепторов электронов также можно регистрировать фотометрически. Последний метод оценки активности ФС2 является более универсальным, так как он применим и для препаратов с нефункциональным кислород-выделяющим комплексом (КВК). В этом случае используются искусственные доноры электронов (дифенилкарбазид, ионы Mn^{2+} , донорная система $Mn^{2+} + H_2O_2$ и др.). При этом в качестве акцептора электронов наиболее часто используется окислительно-восстановительный индикатор 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ), который при фотоиндуцированном восстановлении фотосистемой 2 обесцвечивается [2–4].

В состав активных центров ферментов, в том числе белковых комплексов электрон-транспортной цепи фотосинтеза, входят ионогенные группы, для изучения свойств которых получают рН-зависимости ферментативной активности. При этом важно, чтобы используемая методика оценки активности была применима во всем исследуемом диапазоне величин рН. Важная особенность ДХФИФ состоит в том, что он может протонироваться или депротонироваться с образованием «розовой» и «синей» форм при изменении рН среды [5]. Эту особенность необходимо учитывать при изучении рН-зависимостей реакций электронного транспорта фотосинтезирующих объектов с помощью фотометрии.

В данной работе мы исследовали особенности измерения скорости электронного транспорта в ФС2 с помощью ДХФИФ при различных величинах рН среды. Было установлено, что при определении скорости восстановления ДХФИФ ФС2 на длине волны 600 нм могут быть получены неоднозначные результаты при использовании в расчетах различных величин рК акцептора электронов, известных из литературы. Эта неоднозначность может быть устранена при использовании для из-

мерений активности длины волны 522 нм (изобесцветической точки ДХФИФ). Кроме того, показано, что ингибирование фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ в щелочной области может быть в значительной степени обусловлено его депротонированием, затрудняющим связывание с Q_B -сайтом на акцепторной стороне ФС2.

Материалы и методы

Мембранные препараты ФС2 с активным кислород-выделяющим комплексом (ВВУ-частицы) выделяли из рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. согласно опубликованной методике [6] с незначительными изменениями [7]. Их спектральные и функциональные характеристики соответствовали ранее измеренным [8]. Согласно литературным данным акцепторная сторона таких препаратов ФС2 полностью сохраняет пластохиноны Q_A , Q_B и несколько пластохинонов пула [9]. Полученные препараты хранили при -80°C в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу, 50 мМ 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (Mes), рН 6,5. Суммарную концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно известному методу [10]; во всех экспериментах она составляла 10 мкг/мл. Перед измерениями препараты размораживали в темноте при температуре -5°C в течение часа.

Скорость электронного транспорта в препаратах ФС2 регистрировали фотометрически на спектрофотометре Spexord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кюветках с длиной оптического пути 0,4 см. Источниками возбуждающего света были светодиоды с максимумами 450 нм (при измерении восстановления ДХФИФ) и 650 нм (при измерении восстановления феррицианида калия (ФЦК)), обеспечивающие насыщающую интенсивность света $1800 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Фотоиндуци-

рованные изменения оптической плотности регистрировали при длинах волн 522 и 600 нм (ДХФИФ), а также 420 нм (2,6-дихлоро-*n*-бензохинон (ДХБХ) + ФЦК). Для отсекающего возбуждающего света перед фотоэлектронным умножителем спектрофотометра устанавливали стеклянные светофильтры: желтый ЖС-18 (при длине волны регистрации 522 нм), оранжевый ОС-14 (при длине волны регистрации 600 нм) и синий СС-15 (при длине волны регистрации 420 нм).

рН-измерения проводили в буферных растворах, содержащих 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу, 50 мМ лимонную кислоту (для диапазона рН 4,0–5,0), 50 мМ Mes (для диапазона рН 5,5–6,5), 50 мМ НЕРЕС (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту) (для диапазона рН 7,0–8,0). Необходимую величину рН буферного раствора получали добавлением концентрированного раствора NaOH.

Результаты и обсуждение

ДХФИФ может существовать в растворе в двух формах в зависимости от величины рН среды: протонированной (ДН, «розовая» форма) и депротонированной (D^- , «синяя» форма) с максимумами поглощения 515 и 605 нм соответственно. При восстановлении этих форм образуются продукты H_2D^- и H_2DN , практически не поглощающие свет в видимой области [5, 11]. Структурные формулы различных форм ДХФИФ приведены на рис. 1А. Интенсивное поглощение в видимой области, физиологически приемлемый окислительно-восстановительный потенциал (E_m лежит в интервале от +130 мВ до +217 мВ [12, 13]) и реакция обесцвечивания при восстановлении являются причинами широкого использования ДХФИФ для регистрации транспорта электронов в различных фотосинтетических объектах.

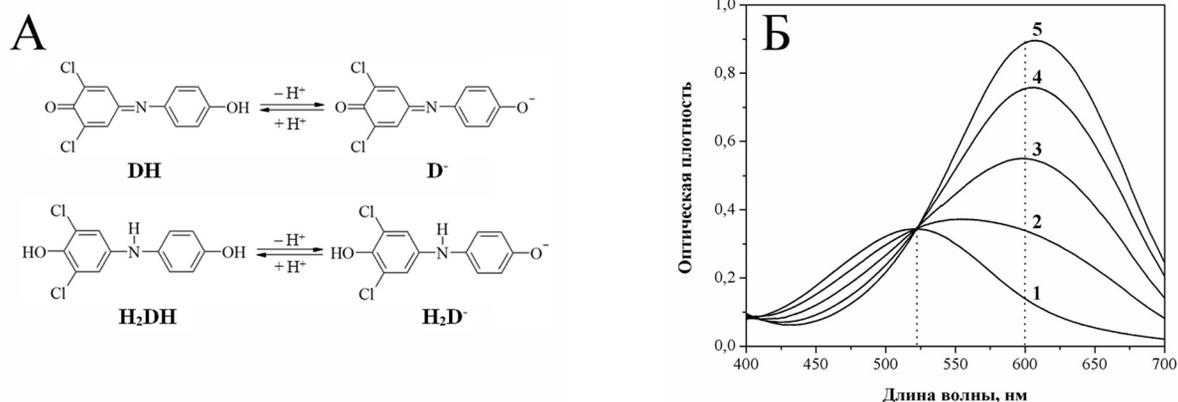


Рис. 1. Реакции протонирования/депротонирования ДХФИФ (А) и влияние рН на спектры его поглощения (Б). А. Схемы реакций протонирования/депротонирования окрашенных форм D^- и ДН ДХФИФ (вверху) и восстановленных лейко-форм H_2D^- и H_2DN (внизу). Для последней реакции рК составляет 7,0 [10]. Б. Спектры поглощения ДХФИФ при различных величинах рН: 1 – 4,5; 2 – 5,5; 3 – 6,0; 4 – 6,5; 5 – 7,5. Спектры получены в буферных растворах, состав которых приведен в разделе «Материалы и методы», в кювете с длиной оптического пути 1 см. Концентрация ДХФИФ (суммарно протонированной и депротонированной форм) составляет 40 мкМ. Вертикальные пунктирные линии соответствуют длинам волн, на которых проводилось измерение скорости фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ ФС2 – 522 нм и 600 нм.

На рис. 1Б приведены спектры поглощения ДХФИФ в средах с различными величинами рН. При $\text{pH} < 4$ ДХФИФ находится практически полностью в «розовой» форме DH , при $\text{pH} > 7$ — в «синей» форме D^- [11]. В диапазоне рН от 4 до 7 единиц присутствуют обе формы в различных соотношениях, зависящих от рН и константы диссоциации. При увеличении рН наблюдается закономерная трансформация спектра поглощения, являющегося суперпозицией спектров двух форм: сдвиг максимума в длинноволновую область и рост оптической плотности в максимуме. Спектры пересекаются в изобестической точке 522 нм. При этой длине волны коэффициенты молярной экстинкции «розовой» и «синей» форм совпадают ($\epsilon_{522} = 8600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [14]).

При использовании ДХФИФ в качестве акцептора электронов для исследования транспорта электронов в тилакоидных мембранах влияние рН на результаты измерений незначительно, так как оптимальная величина рН при этом составляет 7,5. При этом значении рН ДХФИФ находится полностью в депротонированной D^- форме. Другая ситуация имеет место в случае исследования мембранных препаратов ФС2 (ВВУ-частиц), когда оптимум рН для измерения активности находится в достаточно широком диапазоне 6,0–7,0. В этом случае в растворе будут присутствовать в разных соотношениях обе формы ДХФИФ — DH и D^- . Аналогичная картина будет наблюдаться и при получении рН-зависимостей электронного транспорта в фотосинтетических объектах.

Чаще всего для фотометрического измерения скорости фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ фотосинтетическими объектами используют длину волны 600 нм вблизи максимума поглощения «синей» формы [15]. Однако при этой длине волны коэффициенты молярной экстинкции «розовой» и «синей» форм различаются почти на порядок. Чтобы выявить влияние рН-зависимого перехода ДХФИФ между формами DH и D^- на измеряемые величины скорости транспорта электронов, мы исследовали зависимости скорости восстановления этого акцептора электронов мембранными препаратами ФС2 от величины рН среды при двух длинах волн — 600 нм и 522 нм (изобестическая точка). Типичные кинетические кривые фотоиндуцированного изменения оптической плотности при восстановлении ДХФИФ ВВУ-частицами ФС2 приведены на рис. 2. Во время освещения (30 с) наблюдалось практически линейное снижение оптической плотности на обеих длинах волн и при всех величинах рН среды исследуемого диапазона (4,0–8,0). Для расчета скорости снижения оптической плотности кинетические кривые аппроксимировали прямой в программе OriginPro 2015. Активность препаратов рассчитывали, исходя из угловых коэффициентов полученных прямых.

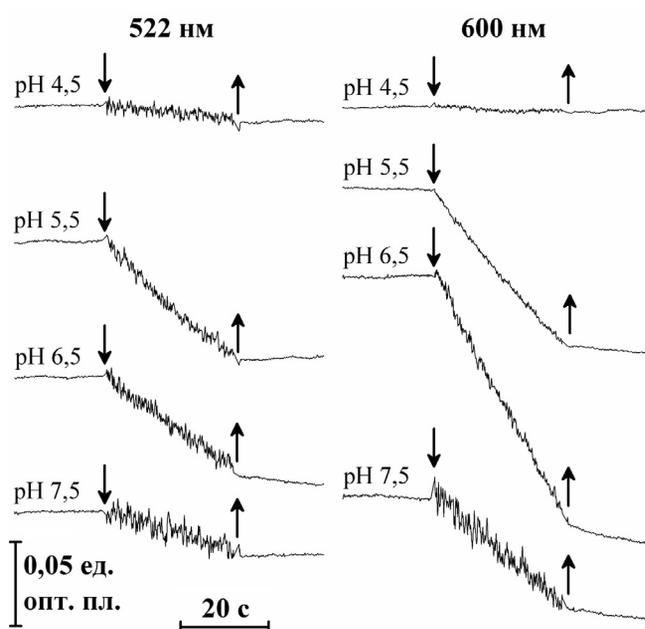


Рис. 2. Кинетические кривые фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ ВВУ-частицами ФС2 на длинах волн 522 нм (слева) и 600 нм (справа) в средах с различной величиной рН. Концентрация ДХФИФ составляла 80 мкМ (минимальная насыщающая концентрация). Стрелками обозначены моменты включения (↓) и выключения (↑) возбуждающего света. Ед. опт. пл. — единицы оптической плотности.

На рис. 3А (кривая 1) приведена зависимость активности ВВУ-частиц ФС2 от величины рН среды, полученная при длине волны 522 нм. Кривая имеет колоколообразный вид с максимумом при величине рН 5,5. Полные зависимости активности ФС2 от величины рН приведены во многих работах [16–20]. При этом измеряемым параметром была скорость выделения кислорода, регистрируемая с использованием различных искусственных акцепторов электронов. рН-зависимость скорости восстановления ДХФИФ как показателя активности ФС2 исследовалась ранее лишь в работах [21, 22]. Снижение активности препаратов ФС2 в кислой области (при рН 5,0 и менее) может быть связано с диссоциацией трех периферических белков КВК PsbP, PsbQ и PsbO [23]. В щелочной области (при рН 6,0 и более) причиной ингибирования может быть экстракция из КВК ионов Cl^- [19].

При расчете активности ВВУ-частиц ФС2 (в единицах $\text{мкмоль ДХФИФ} \cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) на основании скорости фотоиндуцированного снижения оптической плотности при длине волны 600 нм возникают трудности, связанные с присутствием в среде двух форм ДХФИФ (DH и D^-) и их взаимными переходами при варьировании рН. При 600 нм мы использовали для определения активности кажущийся коэффициент молярной экстинкции акцептора, который рассчитывали по формуле:

$$\varepsilon_{600}(\text{pH}) = \frac{\varepsilon_{600}(\text{DH}) + \varepsilon_{600}(\text{D}^-) \cdot 10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}},$$

где $\varepsilon_{600}(\text{DH}) = 2700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\varepsilon_{600}(\text{D}^-) = 22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ – коэффициенты молярной экстинкции «розовой» и «синей» форм, а pK – отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации ДХФИФ [14]. Эта формула может быть получена из условий аддитивности оптической плотности и равновесного соотношения концентраций двух форм акцептора при варьировании pH . По данным разных авторов, величина pK ДХФИФ варьирует в широком диапазоне от 5,57 до 5,9 [5, 11, 14]. Причиной неоднозначности определения величины pK может быть нестойкость протонированной формы ДХФИФ в кислой среде [14]. pH -зависимости активности ФС2, рассчитанные

с использованием величин pK 5,57, 5,7 и 5,9, приведены на рис. 3А (кривые 2, 3 и 4). При использовании в расчетах различных величин pK максимум на pH -зависимости скорости восстановления ДХФИФ остается в диапазоне 5,5–6,0, в то же время абсолютное значение максимальной активности существенно варьирует. Так, при увеличении pK от 5,57 до 5,9 максимальная активность возрастает на 27,6%. Таким образом, величины активности препаратов ФС2, рассчитанные на основании скорости восстановления ДХФИФ, определяемой по уменьшению оптической плотности при 600 нм, в значительной степени чувствительны к используемой в расчетах величине pK акцептора электронов. В то же время при использовании длины волны 522 нм, при которой обе формы ДХФИФ имеют одинаковый коэффициент экстинкции,

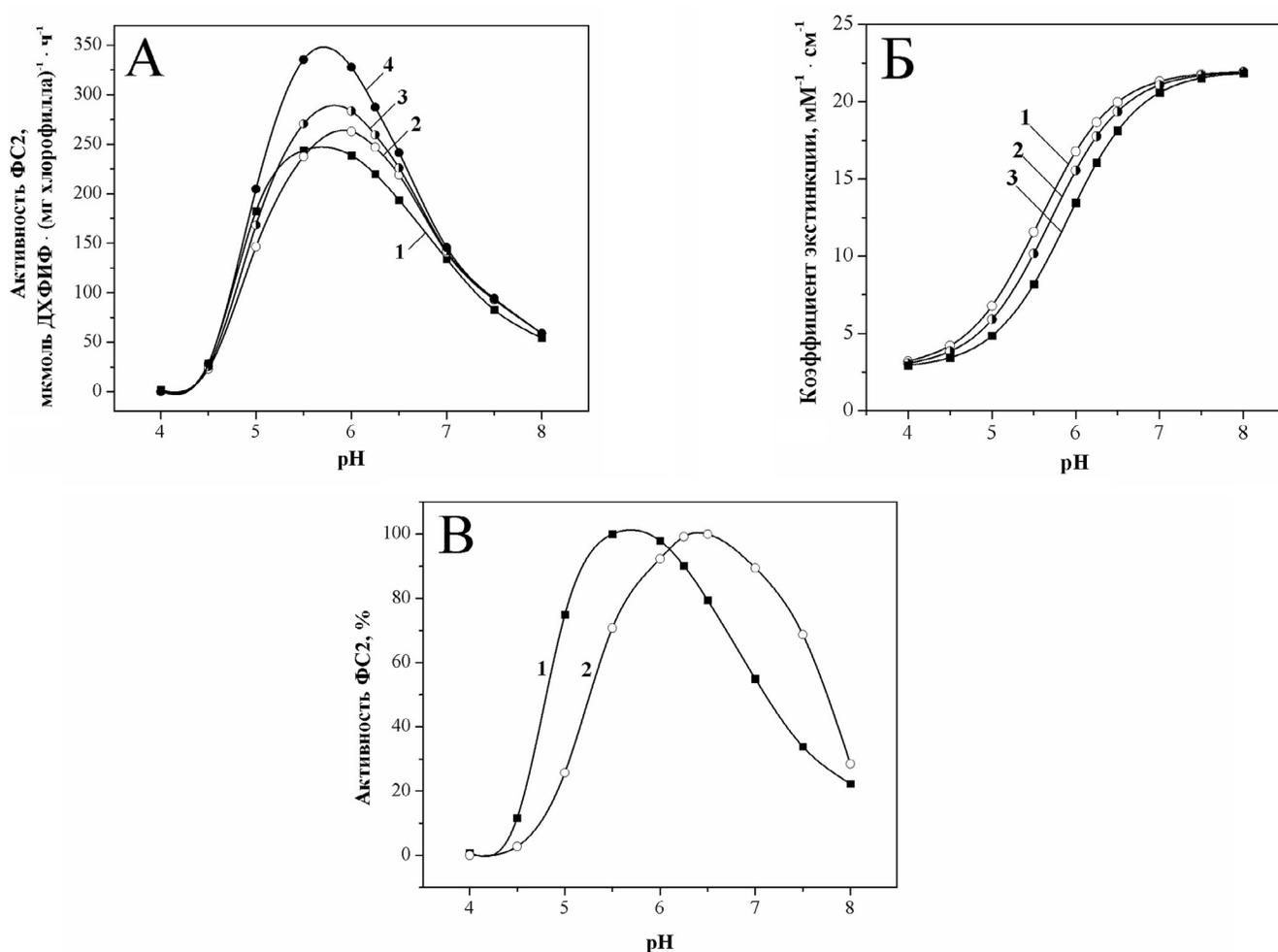


Рис 3. pH -зависимости скорости восстановления искусственных акцепторов электронов (активности) ФС2. **А.** pH -зависимости активности ФС2, измеренной по скорости восстановления ДХФИФ. Кривая 1 – измерения при длине волны 522 нм. Кривые 2, 3, 4 – измерения при длине волны 600 нм. Для определения активности использовались кажущиеся коэффициенты молярной экстинкции ДХФИФ при 600 нм, рассчитанные по формуле, приведенной в тексте, с pK 5,57 (кривая 2), 5,7 (кривая 3) и 5,9 (кривая 4). **Б.** Зависимости кажущегося коэффициента экстинкции ДХФИФ при 600 нм от pH , рассчитанные по формуле, приведенной в тексте, с pK 5,57 (кривая 1), 5,7 (кривая 2) и 5,9 (кривая 3). **В.** pH -зависимости активности (нормированной на максимальное значение) ФС2, полученные при использовании в качестве электронных акцепторов ДХФИФ (длина волны измерения 522 нм, кривая 1) и пары ДХБХ + ФЦК (длина волны измерения 420 нм, кривая 2). Концентрации ДХФИФ, ДХБХ и ФЦК составляли 80 мкМ, 200 мкМ и 2 мМ соответственно. Максимальная абсолютная величина активности, измеренной в присутствии пары ДХБХ + ФЦК (при pH 6,5), составила $2100\text{--}2200 \text{ мкмоль ФЦК} \cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$.

подобные сложности не возникают. При этой длине волны регистрируемое фотоиндуцированное снижение оптической плотности будет отражать суммарную скорость восстановления ФС2 обеих форм акцептора вне зависимости от их соотношения, определяемого величиной рН среды. Следовательно, не требуется вносить поправки, связанные с рН-зависимостью коэффициента экстинкции. Дополнительным преимуществом использования длины волны 522 нм (по сравнению с 600 нм) является более интенсивное поглощение при этой длине волны протонированной формы ДХФИФ, что позволяет надежнее измерять относительно низкую активность препаратов ФС2 в кислой области.

Следует отметить, что форма рН-зависимостей активности ВВУ-частиц ФС2, приведенных в опубликованных работах [16–21], значительно варьирует. При этом изменяется как положение максимума, так и ширина области, в которой активность максимальна и практически постоянна. Причиной различий может быть как сам препарат ФС2, используемый при измерении, так и акцептор (акцепторы) электронов. Чтобы выявить влияние природы акцептора электронов на форму зависимостей активности ФС2 от величины рН среды, мы на одних и тех же препаратах ФС2 параллельно измерили рН-зависимости с ДХФИФ и акцепторной парой ДХБХ + ФЦК. ДХБХ относится к той же группе акцепторов электронов ФС2, что и ДХФИФ (аналоги хинона – акцепторы, связывающиеся с Q_B -сайтом) [1]. При использовании ДХБХ в паре с ФЦК последний выполняет роль неконкурентного вторичного акцептора электронов. ФЦК окисляет восстановленный ФС2 ДХБХ и тем самым поддерживает концентрацию окисленного хинона на постоянном уровне [1]. В данном случае вторичный акцептор электронов ФЦК выполняет роль «стока» электронов, донируемых ФС2 при фотоокислении воды. Восстановление ФЦК регистрировали фотометрически в его максимуме поглощения 420 нм ($\epsilon_{420} = 1020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). На рис. 3Б приведены зависимости активности ВВУ-частиц ФС2 (в % от максимального значения) от величины рН среды для ДХФИФ (измерение при 522 нм) и пары акцепторов электронов ДХБХ + ФЦК. Максимум активности ФС2 при использовании ДХФИФ (при рН 5,5) смещен на одну единицу в кислую область по сравнению с максимумом при использовании ДХБХ и ФЦК. Следует отметить, что авторы одной из работ [21] также обнаружили смещение максимума активности частиц ФС2, измеренной по скорости восстановления ДХФИФ, в кислую область по сравнению с максимумом активности, измеренной по скорости выделения кислорода в присутствии акцептора электронов фенил-*n*-бензохинона. Важно отме-

тить, что снижение активности при переходе из нейтральной в щелочную область для ДХФИФ выражено существенно сильнее, чем для ДХБХ + ФЦК. При рН 7,0 скорость восстановления ФЦК снижается лишь на 10% по сравнению с максимальной скоростью при рН 6,5, а скорость восстановления ДХФИФ – на 45% по сравнению с максимальной скоростью при рН 5,5. Причиной различий рН-ингибирования активности ФС2 в щелочной области при использовании в качестве акцепторов электронов ДХФИФ и пары ДХБХ + ФЦК является природа самих акцепторов. Вероятно, при прочих равных условиях (концентрация акцептора электронов, уровень ингибирования ФС2 при определенной величине рН) скорости переноса электрона с ФС2 на протонированную и депротонированную форму ДХФИФ различаются. При этом доступность участка связывания акцептора электронов – гидрофобного Q_B -сайта ФС2 – для незаряженной протонированной формы должна быть выше, чем для заряженной депротонированной формы [15]. Следует отметить, что возможность восстановления ДХФИФ непосредственно в Q_B -сайте на сегодняшний день остается лишь предположением. Не исключено, что ДХФИФ восстанавливается от пластохинола Q_BH_2 . Однако пластохинон Q_B и его полностью восстановленная форма Q_BH_2 связаны с белком D1 ФС2 относительно непрочно и могут замещаться в Q_B -сайте как ингибиторами электронного транспорта, так и экзогенными акцепторами электронов [24]. В любом случае свободный Q_B -сайт ФС2 или связанный с ним Q_BH_2 находятся в глубине гидрофобной области мембраны, и доступность их для ДХФИФ будет зависеть от его заряда, то есть от его состояния (протонированного или депротонированного). Так как в щелочной области в среде преобладает депротонированная форма ДХФИФ, менее эффективно акцептирующая электроны от ФС2 по сравнению с протонированной формой, снижение скорости восстановления ДХФИФ при росте рН происходит достаточно резко.

Таким образом, при использовании ДХФИФ в качестве акцептора электронов для исследования электронного транспорта в ФС2 даже при незначительном варьировании рН среды необходимо учитывать не только зависимость активности фермента от рН как таковую, но и дополнительный фактор – изменение соотношения «розовой» и «синей» форм, являющихся, вероятно, акцепторами разной «силы».

Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wiwczar J., Brudvig G.W.* Alternative electron acceptors for photosystem II // *Photosynthesis: structures, mechanisms, and applications* / Eds. H. Hou, M. Najafpour, G. Moore, and S. Allakhverdiev. Cham: Springer, 2017. P. 51–66.
2. *Vernon L.P., Shaw E.R.* Photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by diphenylcarbazine: a photosystem 2 reaction catalyzed by tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragments // *Plant Physiol.* 1969. Vol. 44. N 11. P. 1645–1649.
3. *Chernev P., Fischer S., Hoffmann J., Oliver N., Assunção R., Yu B., Burnap R.L., Zaharieva I., Nürnberg D.J., Haumann M., Dau H.* Light-driven formation of manganese oxide by today's photosystem II supports evolutionarily ancient manganese-oxidizing photosynthesis // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. N 1: 6110.
4. *Lovyagina E.R., Loktyushkin A.V., Semin B.K.* Effective binding of Tb³⁺ and La³⁺ cations on the donor side of Mn-depleted photosystem II // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2021. Vol. 26. N 1. P. 1–11.
5. *Eröss K., Svehla G., Erdey L.* The use of 2,6-dichlorophenolindophenol as indicator in acid-base titrations // *Anal. Chim. Acta.* 1964. Vol. 31. P. 246–250.
6. *Berthold D.A., Babcock G.T., Yocum C.F.* A highly resolved, oxygen evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes: EPR and electron transport properties // *FEBS Lett.* 1981. Vol. 134. N 2. P. 231–234.
7. *Loktyushkin A.V., Lovyagina E.R., Semin B.K.* Interaction of terbium cations with the donor side of photosystem II in higher plants // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 2. P. 81–85.
8. *Dunahay T.G., Staechelin L.A., Seibert M., Ogilvie P.D., Berg S.P.* Structural biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem 2 preparations from spinach // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1984. Vol. 764. N 2. P. 179–193.
9. *Kurreck J., Seeliger A.G., Reifarh F., Karge M., Renger G.* (1995). Reconstitution of the endogenous plastoquinone pool in photosystem II (PS II) membrane fragments, inside-out-vesicles, and PS II core complexes from spinach // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. N 48. P. 15721–15731.
10. *Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E.* Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1989. Vol. 975. N 3. P. 384–394.
11. *Tonomura B., Nakatani H., Ohnishi M., Yamaguchi-Ito J., Hiromi K.* Test reactions for a stopped-flow apparatus: Reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol and potassium ferricyanide by L-ascorbic acid // *Anal. Biochem.* 1978. Vol. 84. N 2. P. 370–383.
12. *Petrova A., Mamedov M., Ivanov B., Semenov A., Kozuleva M.* Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes // *Photosyn. Res.* 2018. Vol. 137. N 3. P. 421–429.
13. *Jahn B., Jonasson N.S., Hu H., Singer H., Pol A., Good N.M., Op den Camp H.J.M., Martinez-Gomez N.C., Daumann L.J.* Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020. Vol. 25. N 2. P. 199–212.
14. *Armstrong J.M.D.* The molar extinction coefficient of 2, 6-dichlorophenol indophenol // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1964. Vol. 86. N 1. P. 194–197.
15. *Izawa S.* Acceptors and donors and chloroplast electron transport // *Methods in Enzymology. Photosynthesis and Nitrogen Fixation – Part C*, vol. 69 / Eds. A. San Pietro. Cambridge: Academic Press, 1980. P. 413–434.
16. *Schlodder E., Meyer B.* pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll aII (P-680) in Photosystem II particles from *Synechococcus* sp // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1987. Vol. 890. N 1. P. 23–31.
17. *Vass I., Styring S.* pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. N 3. P. 830–839.
18. *Haddy A., Hatchell J.A., Kimel R.A., Thomas R.* Azide as a competitor of chloride in oxygen evolution by photosystem II // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38. N 19. P. 6104–6110.
19. *Schiller H., Dau H.* Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S2-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2000. Vol. 55. N 2–3. P. 138–144.
20. *Semin B.K., Davletschina L.N., Aleksandrov A.Yu., Lanchinskaya V.Yu., Novakova A.A., Ivanov I.I.* pH-dependence of iron binding to the donor side of photosystem II // *Biochemistry (Mosc.).* 2004. Vol. 69. N 3. P. 410–419.
21. *Damoder R., Dismukes G.C.* pH dependence of the multiline, manganese EPR signal for the 'S2' state in PS II particles: Absence of proton release during the S1 → S2 electron transfer step of the oxygen evolving system // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 174. N 1. P. 157–161.
22. *Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M.* Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca²⁺-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // *Photosyn. Res.* 2013. Vol. 117. N 1. P. 385–399.
23. *Ono T., Inoue Y.* Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 227. N 2. P. 147–152.
24. *Zharmukhamedov S.K., Allakhverdiev S.I.* Chemical inhibitors of photosystem II // *Russian J. Plant Physiol.* 2021. Vol. 68. N 2. P. 212–227.

Поступила в редакцию 09.07.2021

После доработки 17.09.2021

Принята в печать 07.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Features of using 2,6-dichlorophenolindophenol as an electron acceptor in photosynthesis studies

A.V. Loktyushkin* , E.R. Lovyagina , B.K. Semin 

*Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow 119234, Russia*

**e-mail: allokt@gmail.com*

2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) is a redox indicator widely used to study electron transfer reactions in biological systems, including in the process of photosynthesis. DCPIP exists in solution in two forms – “pink” and “blue,” which transform into each other during protonation/deprotonation. Upon reduction, the DCPIP is discolored. We investigated the pH-dependence of DCPIP reduction rate in the presence of the photosystem II (PSII) at two wavelengths – 522 nm (isobestic DCPIP point) and 600 nm (near the absorption maximum of the deprotonated “blue” form). It was shown that in experiments with change of the pH medium, measuring at a wavelength of 600 nm requires corrections related to changing the ratio of the “blue” and “pink” forms of the acceptor, as well as using the pK parameter of this acceptor, whose values pK vary in various sources, to calculate the DCPIP reduction rate. Measurements at the isobestic point (522 nm) avoid these complexities. We also found that the maximum at the pH-dependence of the DCPIP reduction rate by PSII shifted by about 1 unit to the acidic region relative to the maximum of the acceptor pair 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone – potassium ferricyanide reduction rate pH-dependence. This shift may be due to the lower availability of the Q_B site on the acceptor side PSII for the charged deprotonated DCPIP form compared to the uncharged protonated form.

Keywords: *2,6-dichlorophenolindophenol, photosystem II, pH-dependence, electron acceptors, 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone, potassium ferricyanide, photometry*

Funding: The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 121032500058-7

Сведения об авторах

Локтюшкин Алексей Владимирович – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: allokt@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-9082-1966>

Ловягина Елена Рудольфовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: elena.lovyagina@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-3586-0575>

Семин Борис Константинович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: semin@biophys.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-0058-2798>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.14

Влияние фитогормонов на экспрессию генов *USP* в проростках *Arabidopsis thaliana*Д.С. Горшкова^{1, 2, *} , Е.С. Пожидаева² ¹Кафедра физиологии растений, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Российская академия наук, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

*e-mail: dsgorshkova@yandex.ru

Универсальные стрессовые белки (Universal Stress Proteins, USP) являются потенциальными участниками процессов, контролирующими морфогенез растений, в которых важная роль отводится фитогормонам. В данном исследовании был выполнен поиск генов *USP Arabidopsis thaliana*, изменяющих свою экспрессию в ответ на действие фитогормонов. Выявлены 15 генов *USP*, экспрессия которых дифференциально регулируется двумя и более фитогормонами. Причем, накопление транскриптов у большинства из исследованных генов наблюдали при действии гормонов, участвующих в формировании устойчивости растений к стрессу – абсцизовой кислоты, этилена и метилжасмоната. В то же время ауксины и гиббереллины – гормоны, регулирующие рост растений, – подавляли экспрессию изученных генов *USP*. Полученные результаты выявили потенциальные гены *USP*, чья функциональная активность напрямую или опосредовано может быть связана с фитогормон-зависимыми процессами, обеспечивающими жизнедеятельность растений в нормальных и стрессовых условиях.

Ключевые слова: абсцизовая кислота, ауксины, гиббереллины, метилжасмонат, универсальные стрессовые белки, этилен, *Arabidopsis thaliana*, GRUSP

Универсальные стрессовые белки растений (Universal Stress Proteins, USP) были впервые охарактеризованы на основании сходства их аминокислотных последовательностей с бактериальными USP [1]. У прокариот USP накапливаются в ответ на стресс и участвуют в формировании устойчивости к неблагоприятным факторам [2, 3]. Как и у прокариот, USP растений выполняют важную роль в условиях абиотических и биотических воздействий [4, 5]. Установлено, что трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*A. thaliana*) со сверхэкспрессией белка AtUSP обладают повышенной устойчивостью к окислительному и температурному стрессам [6, 7]. В растениях в формировании устойчивости к неблагоприятным воздействиям участвуют фитогормоны, в том числе – за счет их способности модулировать экспрессию генов стрессовых белков [8]. Для ряда генов *USP* показано изменение их экспрессии в ответ на действие фитогормонов, участвующих в формировании устойчивости к стрессу, например, абсцизовой кислоты (АБК) [9, 10] или этилена [11]. Это свидетельствует о вовлечении USP в фитогормон-зависимые механизмы устойчивости к стрессу.

Помимо этого, в нестрессовых условиях USP участвуют в гормональной регуляции роста и развития растений. Так, у *A. thaliana* рецептор-подоб-

ная цитоплазматическая киназа STUNTED, содержащая в своем составе USP-домен, необходима для гиббереллин-зависимого контроля клеточного деления [12]. Еще одним примером является белок GRUSP (Germination-Related Universal Stress Protein; ген – *At3g58450*), участвующий в АБК- и гиббереллин-зависимых механизмах прорастания и перехода к цветению [10, 13–14]. Несмотря на активное изучение растительных USP, в настоящее время практически отсутствуют исследования их роли в физиологических процессах, контролируемых фитогормонами.

В настоящем исследовании с использованием биоинформатического анализа был осуществлен поиск генов *USP*, экспрессия которых изменяется в ответ на действие фитогормонов. После чего методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qRT-PCR) было детально исследовано воздействие фитогормонов на экспрессию отобранных генов *USP* в двухнедельных проростках *A. thaliana*.

Материалы и методы**Объект исследования и условия выращивания.**

В исследовании использовали двухнедельные проростки *A. thaliana* дикого типа (экотип Columbia, Col-0). Для их получения семена стерилизовали

в течение 10 мин в растворе 50%-ного гипохлорита натрия, содержащего Tween-20 в конечной концентрации 0,02%. Семена высевали на агаризованную (0,8%) питательную среду Мурасиге-Скуга (MS; Duchefa, Нидерланды) в половинной концентрации и стратифицировали при 4 °С в течение 3 сут в темноте. Далее семена проращивали в условиях 16-часового фотопериода при 21 °С и интенсивности освещения 120 мкМ фотонов·с⁻¹·м⁻².

Обработка фитогормонами. Двухнедельные проростки Col-0 переносили в чашки Петри на три слоя фильтровальной бумаги, увлажненной средой MS, содержащей фитогормоны (Sigma, Германия) в ранее подобранных [15] конечных концентрациях: 5 мкМ гиббереллинов (ГК), 50 мкМ АБК, 50 мкМ метилжасмоната (МЖ), 1 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК) или 10 мкМ предшественника биосинтеза этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилевой кислоты (АЦК). Контрольные проростки инкубировали на питательной среде без добавления фитогормонов. Проростки инкубировали в течение 3 или 24 ч, после чего 100 мг проростков каждого из образцов фиксировали в жидком азоте для выделения РНК.

Выделение РНК и qRT-PCR. РНК выделяли с использованием TRIzol-реагента (Thermo Fisher Scientific, США) согласно стандартному протоколу. Очистку РНК от примеси ДНК проводили с применением ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей проверкой качества очистки методом полимеразной цепной реакции. Обратную транскрипцию проводили с использованием олиго(dT)18-праймера (Евроген, Россия) и обратной транскриптазы RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). qRT-PCR проводили в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) на амплификаторе Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). Анализ относительной экспрессии генов проводили, используя программное обеспечение Light Cycler 96 (Roche, Швейцария). В качестве референсного гена использовали ген убиквитин-конъюгирующего фермента UBC10 (*At5g53300*). Список праймеров представлен в табл. 1. Праймеры для qRT-PCR подбирали с применением программного обеспечения Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, США) и их специфичность оценивали в Primer BLAST на сервере NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Биоинформатический анализ. Для идентификации генов *A. thaliana*, кодирующих USP, был проведен поиск белковых последовательностей, содержащих в своей структуре USP-домен (PFAM PF00582). Поиск осуществляли в базе данных NCBI с использованием инструмента DELTA-BLAST (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST), позволяющего применять данные из базы консервативных доменов (Conserved Domain Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). В качестве ша-

блона использовали последовательность USP MJ0577 (Uniprot Q57997) из *Methanocaldococcus jannaschii*. В дальнейшем информацию о генах идентифицированных последовательностей USP *A. thaliana* получали из баз данных TAIR (<https://arabidopsis.org>). Анализ транскриптомных карт *A. thaliana* и характеристику паттернов экспрессии генов USP проводили на основе данных из базы Transcriptome Variation Analysis (TraVA), интегрированных в графическую оболочку eFP Browser (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) [15]. Для этого на основании цифровых значений уровня экспрессии целевых генов, полученных из этой базы данных, строили тепловые карты при помощи Microsoft Office Excel (США), а затем на их основе отбирали гены, экспрессия которых статистически значимо изменяется при действии фитогормонов.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 6 (США). Достоверность различий оценивали при помощи двухвыборочного теста ANOVA. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. На диаграммах планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам.

Результаты и обсуждение

Для исследования свойств USP в фитогормон-зависимой регуляции роста и развития растений с применением биоинформатического анализа были идентифицированы 56 генов *A. thaliana*, кодирующих белки, в составе которых присутствует USP-домен. Далее анализ профилей экспрессии на платформе eFP Browser показал, что идентифицированные гены демонстрируют специфичный профиль экспрессии в зависимости от стадии развития. При этом уровень транскрипции 15 генов USP дифференциально регулируется фитогормонами ИУК, ГК, АБК, МЖ и этиленом (табл. 2), которые, в частности, вовлечены в процессы, связанные с прорастанием семян и развитием проростков.

Для более детального анализа полученных данных, методом qRT-PCR были изучены временные изменения (3 и 24 ч) в экспрессии указанных генов USP (табл. 2) в двухнедельных проростках Col-0. Физиологическую реакцию проростков на фитогормоны оценивали в ходе экспериментов по уровню экспрессии маркерных генов (рис. 1) относительно необработанных вариантов. Согласно рис. 1, экспрессия генов *RD21b*, *IAA_19*, *ERF_1* и *ERF-1* возросла в несколько раз при обработке АБК, ИУК, АЦК и МЖ, а экспрессия гена *GA20ox1* снизилась при обработке ГК, что соответствует ожидаемому поведению экспрессии этих генов при обработке фитогормонами на основе литературных данных [16–20]. На рис. 2 и 3 представлены профили

экспрессии исследуемых генов *USP* в ответ на обработку АБК, ГК, ИУК, МЖ и АЦК.

Активность большинства анализируемых генов изменялась при действии АБК (рис. 2А). У шести генов (*At3g58450*, *At3g11930*, *At2g47710*, *At1g77280*, *At2g21620*, *At5g47740*) экспрессия возрастала по мере увеличения времени обработки, в то время как у двух генов (*At3g53990* и *At3g62550*) индукция наблюдалась только в первые 3 ч обработки, но спустя 24 ч уровень их экспрессии возвращался к прежним значениям. По амплитуде ответа на АБК выделяются гены *At3g58450* и *At5g47740*, экспрессия

которых возрастала на 1–2 порядка в ответ на обработку 50 мкМ АБК по сравнению с необработанным вариантом (рис. 2А). Гены *At3g11930*, *At2g47710*, *At1g77280* и *At2g21620* изменяли свою экспрессию в 2–3 раза по сравнению с необработанным контролем. Поскольку АБК играет важную роль при формировании устойчивости к абиотическим воздействиям, наблюдаемая у генов *USP* реакция на АБК вполне ожидаемая и подтверждает ранее полученные результаты, демонстрирующие участие *USP* в формировании устойчивости растений к стрессовым воздействиям [9].

Таблица 1

Последовательности праймеров, используемых в исследовании

Название	Последовательность (5' => 3')	Название гена	Описание согласно базе данных TAIR
GRUSP_F	TTGTTGGTAGCCGTGGACTC	<i>At3g58450</i>	GRUSP
GRUSP_R	GAGGTTTCTCTAGGCCGGTTCG		
UBQ10-F	CACCATTTCCAAGGTGCTGC	<i>At5g53300</i>	Убиквитин-конъюгирующий фермент 10
UBQ10-R	GAGCTATCTCGGGCACCAAA		
77280_F	GGCTCTGGTTAAAGTCGCT	<i>At1g77280</i>	USP
77280_R	GCTTCAGCTTCAGATCCACCT		
63940_F	CAGATTCGGATTCGCCAGC	<i>At5g63940</i>	USP
63940_R	CCCACAAGACAAGGCTCTCC		
13690_F	AAAGAGTGTCCCTTACCATC	<i>At3g13690</i>	USP
13690_R	AAAGGTGAAGTCCCAGGTC		
01520_F	CCCCTGAGGATTTCCGAGAC	<i>At3g01520</i>	USP
01520_R	TCACACAGAACGCACTCACA		
14680_F	TGGTGGCGGTGAATGAATCG	<i>At5g14680</i>	USP
14680_R	AGCCAGAGGTATTGGACCGA		
17020_F	AGTTATGGCGGAGAGTGGTG	<i>At3g17020</i>	USP
17020_R	GTGATCCAACGGTCTCCCAG		
21620_F	TCAGGGAAGTAGTGTGCGCG	<i>At2g21620</i>	RD2 (USP)
21620_R	AGACGGCGTGGACAAGATG		
11360_F	CGACAGTGGTGGGGAGAATC	<i>At1g11360</i>	USP
11360_R	GCTGCTACTGCTTATCCGAAG		
62550_F	CCCCCTTCCCCTTTACTC	<i>At3g62550</i>	USP
62550_R	TCACACTCCCTAGCAAAGCC		
25930_F	TCATCAGTCGGCTTTGCTCA	<i>At3g25930</i>	USP
25930_R	TGTCTCTGCCTTGATCCCAT		
53990_F	STATGTGCATGGGAAGCAGAG	<i>At3g53990</i>	AtUSP (USP)
53990_R	TTATTCGTTATCCTTGACAACG		
47740_F	AGTTGGAAGGGAGAAGCAGC	<i>At5g47740</i>	USP
47740_R	GCAGAGCAGGCATGAAGGAA		
47710_F	GTGATGGTCGTCGGAGTTGA	<i>At2g47710</i>	USP
47710_R	GGAGCGTAAGGAGCGAAGAA		
11930_F	AGCGTTTCTTGGGAGCGTTA	<i>At3g11930</i>	USP
11930_R	TCTCCTTAGGTGGCTTGACA		
RD29b_F	GTGAGAGGTGGTGTAAACGG	<i>At5g52300</i>	RD29b
RD29b_R	GTCGGTGCCTCTCTTTTCG		
GA20-1F	GGCTACGCAAGCAGTTTAC	<i>At4g25420</i>	GA20ox1
GA20-1R	TTGAACGGATTTTGAGCGGC		
IAA19_F	GAGATGTGGCAGAGAAGATG	<i>At3g15540</i>	IAA_19
IAA19_R	TTCCTCAAATAAGGCACACC		
ERF1_F	ATTAGGGTTTGGCTCGGGAC	<i>At3g23240</i>	ERF_1
ERF1_R	GACTCTTGAACCTCTCCGCCG		
ERF-1_F	CGAAGAAGAGGAGAACGGTGG	<i>At4g17500</i>	ERF-1
ERF-1_R	GCCACTTCAACAACCTCGCAC		

Таблица 2

Перечень генов *USP*, экспрессия которых дифференциально регулируется двумя и более фитогормонами по данным транскриптомного анализа из базы eFP Browser

Название гена	Описание	Фитогормоны
<i>At1g11360</i>		АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At1g77280</i>		АБК, ГК, ИУК
<i>At2g21620</i>	RD2	АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At2g47710</i>		АБК, ГК
<i>At3g01520</i>		АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At3g11930</i>		АБК, АЦК, ГК, МЖ
<i>At3g13690</i>		АБК, ИУК
<i>At3g17020</i>		АБК, ГК
<i>At3g25930</i>		АЦК, ГК, МЖ
<i>At3g53990</i>	AtUSP	АБК, ГК, МЖ
<i>At3g58450</i>	GRUSP	АБК, ГК
<i>At3g62550</i>		АЦК, ГК, МЖ
<i>At5g14680</i>		АБК, ГК
<i>At5g47740</i>		АБК, ГК
<i>At5g63940</i>		АБК, ИУК

АБК также участвует в регуляции покоя и прорастания семян. Роль *USP* в этом процессе была показана на примере белка GRUSP [10, 13]. В ходе прорастания семени трансгенной линии, дефицитной по гену *At3g58450*, проявляли более выраженную чувствительность к присутствию в питательной среде АБК, чем семена Col-0 [10]. Вероятно, что белок GRUSP задействован в процессах, связанных с восприятием сигнала АБК

при прорастании. Ранее было показано, что белки AT3G11930 и AT2G47710 являются потенциальными партнерами GRUSP в ГК-индуцируемом формировании проростков [13]. Экспрессия генов *At3g11930* и *At2g47710* также индуцировалась при обработке АБК, но с меньшей интенсивностью, чем *At3g58450* (рис. 2А). Полученные результаты могут служить косвенным свидетельством в пользу взаимодействия белков GRUSP, AT3G11930 и AT2G47710 и в АБК-регулируемых процессах, происходящих в проростках.

Нетипичное для генов *USP* АБК-опосредованное подавление генной экспрессии было выявлено у *At3g13690* (рис. 2А). Уровень его транскриптов значительно снижался в два раза после 24 ч обработки АБК. Согласно данным транскриптомного анализа из базы eFP Browser, транскрипты этого гена отсутствуют при созревании семени, но появляются в прорастающих семенах. Вероятно, функциональная активность белка AT3G13690 инициируется прорастанием и необходима в развивающихся проростках.

Этилен-регулируемые гены *USP* были обнаружены по изменению их экспрессии в проростках, обработанных АЦК. Гены *At3g25930* и *At3g62550* индуцировались в первые 3 ч обработки, два других – *At3g58450* и *At5g47740* – спустя 24 ч (рис. 2Б). При этом амплитуда ответа на АЦК была ниже, чем в случае АБК: *At3g58450* активировался в 4 раза по сравнению с контролем, а *At5g47740* – в 3 раза.

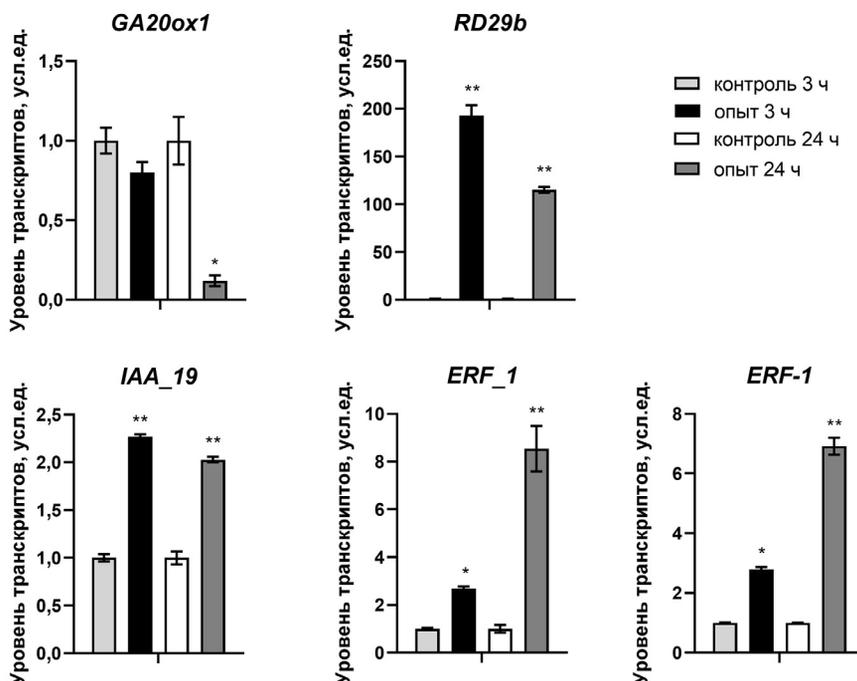


Рис. 1. Уровень экспрессии маркерных генов в двухнедельных проростках при воздействии фитогормонами в течение 3 и 24 ч (опыт) и без обработки (контроль), где: А – 5 мкМ гиббереллинов, Б – 50 мкМ абсцизовой кислоты, В – 1 мкМ индолилуксусной кислоты, Г – 10 мкМ 1-аминоциклопропан-1-карбоксилевой кислоты, Д – 50 мкМ метилжасмоната; контроль – MS. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в десятичной форме. Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам.

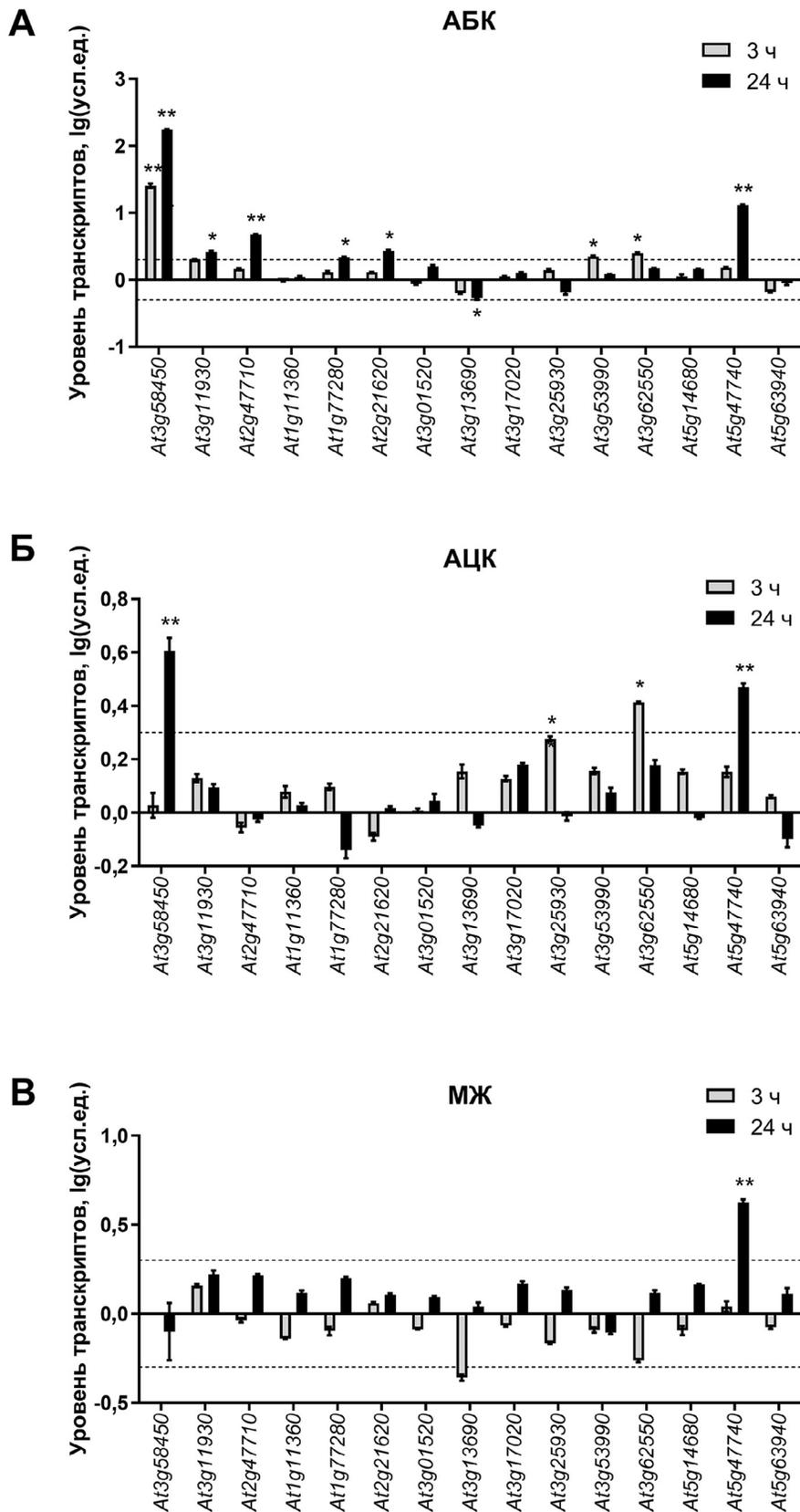


Рис. 2. Экспрессия генов *USP* в двухнедельных проростках *A. thaliana* при действии абсцизовой кислоты (АБК), 1-аминоциклопропан-1-карбоксилловой кислоты (АЦК) и метилжасмоната (МЖ) в течение 3 и 24 ч. А – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 50 мкМ АБК, Б – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 10 мкМ АЦК, В – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 50 мкМ МЖ. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в логарифмической форме. Тонкая пунктирная линия отмечает изменение уровня экспрессии в 2 раза по сравнению с необработанным контролем. Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам, звездочками отмечены значимые различия, уровни значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Как известно, этилен участвует в регуляции многих физиологических процессов, в том числе при прорастании семян [21], старении растений [22] или их реакции на различные стрессовые факторы [23]. Было показано, что *At3g62550* индуцируется в старых листьях [22], а уровень экспрессии *At5g47740* повышается в корнях в ответ на присутствие в среде неорганического фосфата [24]. Вероятно, в дальнейшем функцию соответствующих белков можно исследовать в контексте их участия в этилен-зависимой регуляции процессов, связанных со старением листьев или ростом растений в условиях дефицита фосфора [22, 23]. Ген *At3g58450* также относится к этилен-индуцибельным генам (рис. 2Б), чья экспрессия возрастает через 24 ч действия АЦК. Учитывая, что экспрессия этого гена зависит от стадии развития растения [10], мы предполагаем, что этилен-зависимая функция GRUSP реализуется в стареющих растениях или в прорастающих семенах.

Интересно, что среди изученных генов *USP* только у *At5g47740* наблюдали достоверные изменения в накоплении транскриптов после 24 ч воздействия МЖ (рис. 2В). Это может быть связано с упомянутой выше индукцией *At5g47740* в при-

сутствии неорганического фосфата, поскольку МЖ участвует в ответе растений на дефицит фосфора [25]. Кроме того, в нашем исследовании влияние фитогормонов на экспрессию генов *USP* оценивали в двухнедельных проростках. Это также вносит ограничения в экспрессионный анализ и может объяснять отсутствие реакции *At3g62550* на обработку МЖ. При этом существуют данные об участии *At3g62550* в МЖ-регулируемом развитии тычинок [26]. Возможно, остальные гены *USP* не проявили предсказанной реакции на МЖ при обработке проростков, поскольку участвуют в реализации специфических программ развития.

Обработка двухнедельных проростков экзогенной ГК практически не влияла на экспрессию исследуемых генов (рис. 3А, Б). Более того, для пяти генов (*At1g11360*, *At3g01520*, *At3g17020*, *At5g14680*, *At5g63940*) мы не обнаружили предсказанную в ходе анализа транскриптомов реакцию на гиббереллины (рис. 3Б). Поскольку ГК являются одним из ключевых факторов, стимулирующих прорастание, то изменения в экспрессии этих и других генов *USP* могут проявляться не на стадии двухнедельных проростков, а при набухании и прорастании семени. Действительно, из базы

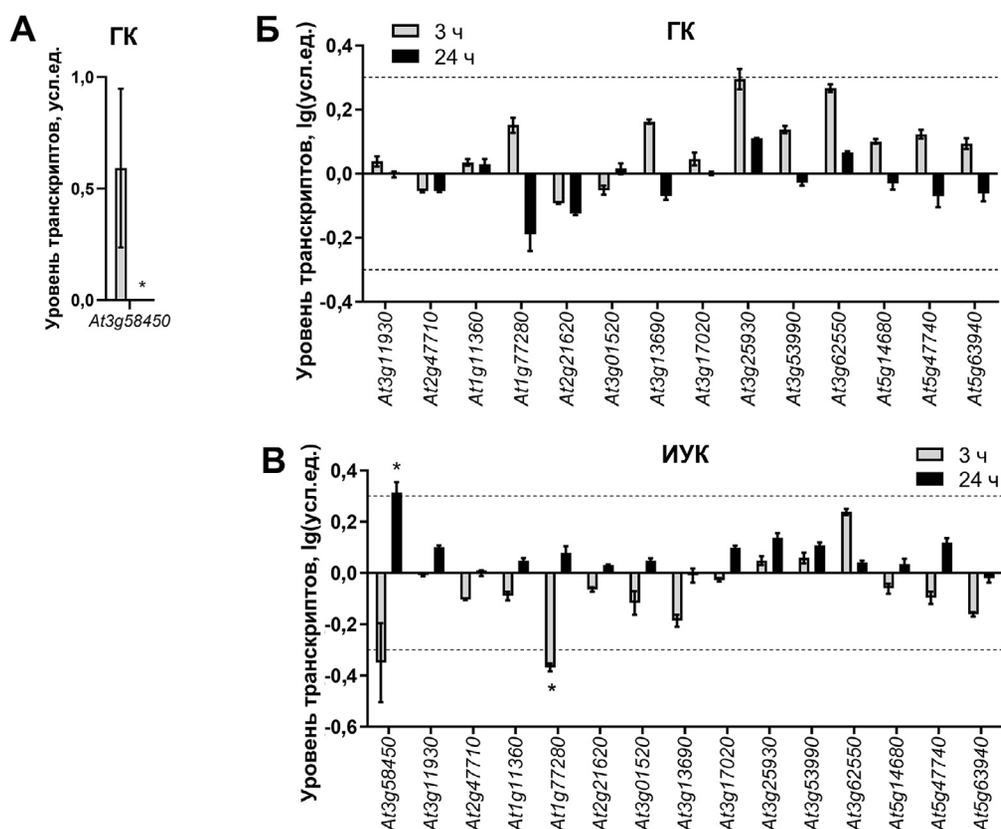


Рис. 3. Экспрессия генов *USP* в двухнедельных проростках *A. thaliana* в ответ на обработку гиббереллинами (ГК) и индолилуксусной кислотой (ИУК) в течение 3 и 24 ч. А – уровень экспрессии гена *At3g58450* в ответ на обработку 5 мкМ ГК, Б – уровень экспрессии остальных генов *USP* при обработке 5 мкМ ГК, В – уровень экспрессии генов *USP* при обработке 1 мкМ ИУК. Нормализация относительно уровня экспрессии гена *UBC10* и относительно уровня экспрессии соответствующих генов в необработанном контроле. Данные представлены в логарифмической форме за исключением экспрессии гена *At3g58450* в присутствии ГК по причине полного подавления гиббереллинами его экспрессии. Тонкая пунктирная линия отмечает изменение уровня экспрессии в 2 раза по сравнению с необработанным контролем. Планки погрешностей соответствуют стандартным ошибкам, звездочками отмечены значимые различия, уровни значимости: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

данных eFP Browser установлено, что транскрипты *At1g11360*, *At1g77280*, *At3g11930*, *At3g53990*, *At3g58450*, *At5g47740* присутствуют только в сухих семенах и, вероятно, ГК-чувствительность их экспрессии ограничивается стадией семени.

Особое место в этом ряду занимает ген *At3g58450* (*GRUSP*), для которого наблюдали достоверное подавление его экспрессии через 24 ч воздействия ГК (рис. 3А). Несмотря на максимальное накопление транскриптов *At3g58450* в сухих семенах и их отсутствие в розеточных листьях, для *At3g58450* экспериментально подтверждено его участие не только в ГК-зависимой регуляции прорастания [13], но и в переходе к цветению [14]. Причем при развитии проростков *GRUSP* опосредованно стимулирует метаболизм ГК и ГК-зависимые ответы, действуя через регуляцию накопления белков из группы DELLA, репрессоров сигнала ГК [13]. В индукции цветения функция белка *GRUSP* реализуется через снижение уровня флорального репрессора FLC и стимуляцию метаболизма ГК и ГК-зависимого пути флоральной индукции [14]. Эти результаты свидетельствуют, что негативная регуляция на транскрипционном уровне является не менее важным результатом при исследовании функции целевого гена и должна рассматриваться на разных этапах развития растения.

Ауксин, еще один ростостимулирующий гормон, либо ингибировал, либо не оказывал заметного эффекта на экспрессию большинства изученных генов *USP* (рис. 3В). Ауксин-регулируемую экспрессию наблюдали только для двух генов: *At3g58450* и *At1g77280*. Уровень транскриптов *At3g58450* незначительно снижался в первые 3 ч обработки ИУК, однако уже спустя 24 ч демонстрировал двукратное увеличение. В случае *At1g77280* была схожая регуляция, однако спустя 24 ч воздействия активация была значительно слабее, и уровень транскриптов *At1g77280* возвращался к исходным значениям. При этом согласно опубликованным данным этот ген относится к ауксин-индуцибельным генам [27].

Выполненный в ходе данного исследования поиск аминокислотных последовательностей, содержащих USP-домен, позволил обнаружить у *A. thaliana* 91 аминокислотную последовательность, соответствующую 56 генам *USP*. Эти результаты уточняют ранее опубликованные исследования [1, 5] и дополняют информацию о белках семейства *USP* в растениях. Анализ транскриптом-

ных карт *A. thaliana* и паттернов экспрессии идентифицированных генов *USP* позволил выделить группу генов, чья транскрипция находится под дифференциальным контролем фитогормон-зависимых факторов. Причем экспрессия большинства изученных генов *USP* индуцируется в присутствии АБК, этилена и МЖ – гормонов, участвующих в формировании устойчивости растений к стрессу. В то же время ауксины и гиббереллины – гормоны, регулирующие рост растений – подавляли экспрессию изученных генов *USP*. Это принципиально новая информация, которая, с одной стороны, еще раз подтверждает, что функциональная активность *USP* растений ассоциирована со стрессовыми воздействиями. С другой стороны, они могут вовлекаться в процессы морфогенеза растений, так или иначе находящиеся под контролем тех же самых гормонов. Среди всех проанализированных генов *USP* наиболее выраженный фитогормональный эффект наблюдали у *At3g58450*, экспрессия которого разнонаправлено регулировалась АБК, АЦК, ИУК и ГК. Наблюдаемая регуляция свидетельствует о важной роли соответствующего белка *GRUSP* на различных этапах формирования растений. Участие *GRUSP* в ГК-опосредованных процессах, связанных с регуляцией прорастания и перехода к цветению, интенсивно исследуется [13, 14]. С нашей точки зрения особый интерес вызывает участие *GRUSP* в АБК-зависимых процессах. Согласно анализу транскриптомов мутантов *abi5* и *abi4/abi5*, дефицитных по генам ключевых регуляторов ответа на АБК, уровень транскриптов *GRUSP* в семенах этих мутантов значительно снижен по сравнению с диким типом, что говорит о возможной взаимосвязи *GRUSP* с путем передачи сигнала АБК [28, 29]. Таким образом, *GRUSP* может играть важную роль во взаимосвязи сигнальных путей различных фитогормонов. Изучение роли *USP* в регуляции роста и развития растений имеет большое значение, поскольку они могут представлять собой потенциально новый и малоизученный класс регуляторных белков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90017. Работа осуществлена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kerk D., Bulgrien J., Smith D.W., Gribskov M. Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 131. N 3. P. 1209–1219.
2. Nyström T., Neidhardt F.C. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli*

during growth arrest // *Mol. Microbiol.* 1994. Vol. 11. N 3. P. 537–544.

3. Vollmer A.C., Bark S.J. Twenty-five years of investigating the universal stress protein: function, structure, and applications // *Adv. Appl. Microbiol.* 2017. Vol. 102. P. 1–36.

4. Chi Y.H., Koo S.S., Oh H.T., Lee E.S., Park J.H., Phan K.A.T., Wi S.D., Bae S.B., Paeng S.K., Chae H.B., Kang C.H., Kim M.G., Kim W.-Y., Yun D.-J., Lee S.Y. The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses // *Front. Plant. Sci.* 2019. Vol. 10: 750.
5. Bhuria M., Goel P., Kumar S., Singh A.K. Genome-wide identification and expression profiling of genes encoding universal stress proteins (USP) identify multi-stress responsive USP genes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiol. Rep.* 2019. Vol. 24. N 3. P. 434–445.
6. Jung Y.J., Melencion S.M.B., Lee E.S., Park J.H., Alinapon C.V., Oh H.T., Yun D.-J., Chi Y.N., Lee S.Y. Universal stress protein exhibits a redox-dependent chaperone function in *Arabidopsis* and enhances plant tolerance to heat shock and oxidative stress // *Front. Plant. Sci.* 2015. Vol. 6: 1141.
7. Melencion S.M.B., Chi Y.H., Pham T.T., Paeng S.K., Wi S.D., Lee C., Ryu S.W., Koo S.S., Lee S.Y. RNA chaperone function of a universal stress protein in *Arabidopsis* confers enhanced cold stress tolerance in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 12: 2546.
8. Verma V., Ravindran P., Kumar P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses // *BMC Plant Biol.* 2016. Vol. 16: 86.
9. Bhuria M., Goel P., Kumar S., Singh A.K. The promoter of AtUSP is co-regulated by phytohormones and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant. Sci.* 2016. Vol. 7: 1957.
10. Gorshkova D.S., Getman I.A., Voronkov A.S., Chizhova S.I., Kuznetsov V.I., Pojidaeva E.S. The gene encoding the Universal Stress Protein AtUSP is regulated by phytohormones and involved in seed germination of *Arabidopsis thaliana* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. Vol. 479. N 1. P. 105–107.
11. Sauter M., Rzewuski G., Marwedel T., Lorbiecke R. The novel ethylene-regulated gene *OsUSP1* from rice encodes a member of a plant protein family related to procaryotic universal stress proteins // *J. Exp. Bot.* 2002. Vol. 53. N 379. P. 2325–2331.
12. Lee L.Y.C., Hou X., Fang L., Fan S., Kumar P.P., Yu H. STUNTED mediates the control of cell proliferation by GA in *Arabidopsis* // *Development.* 2012. Vol. 139. N 9. P. 1568–1576.
13. Gorshkova D.S., Pojidaeva E.S. Members of the Universal Stress Protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germination growth // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. Vol. 68. N 3. P. 451–462.
14. Gorshkova D.S., Getman I.A., Sergeeva L.I., Kuznetsov V.I., Pojidaeva E.S. GRUSP, an universal stress protein, is involved in gibberellin-dependent induction of flowering in *Arabidopsis thaliana* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2021. Vol. 499. N 1. P. 233–237.
15. Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets // *PLoS One.* 2007. Vol. 8: 718.
16. Zentella R., Zhang Z.-L., Park M., Thomas S.G., Endo A., Murase K., Fleet C.M., Jikumaru Y., Nambara E., Kamiya Y., Sun T.-P. Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2007. Vol. 19. N 10. P. 3037–3057.
17. Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000. Vol. 97. N 21. P. 11632–11637.
18. Tatematsu K., Kumagai S., Muto H., Sato A., Watahiki M.K., Harper R.M., Liscum E., Yamamoto K.T. MAS-SUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell.* 2004. Vol. 16. N 2. P. 379–393.
19. McGrath K.C., Dombrecht B., Manners J.M., Schenk P.M., Edgar C.I., Maclean D.J., Scheible W.-R., Udvardi M.K., Kazan K. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139. N 2. P. 949–959.
20. Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J.R. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 // *Genes Dev.* 1998. Vol. 12. N 23. P. 3703–3714.
21. Corbineau F., Xia Q., Bailly C., El-Maarouf-Bouteau H. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5: 539.
22. Gepstein S., Sabehi G., Carp M.-J., Hajouj T., Neshor M.F.O., Yariv I., Dor C., Bassani M. Large-scale identification of leaf senescence-associated genes // *Plant J.* 2003. Vol. 36. N 5. P. 629–642.
23. Song L., Liu D. Ethylene and plant responses to phosphate deficiency // *Front. Plant. Sci.* 2015. Vol. 6: 796.
24. Bari R., Pant B.D., Stitt M., Scheible W.-R. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants // *Plant Physiol.* 2006. Vol. 141. N 3. P. 988–999.
25. Khan G.A., Vogiatzaki E., Glauser G., Poirier Y. Phosphate deficiency induces the jasmonate pathway and enhances resistance to insect herbivory // *Plant Physiol.* 2016. Vol. 171. N 1. P. 632–644.
26. Mandaokar A., Dinesh Kumar V., Amway M., Browne J. Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development // *Plant Mol. Biol.* 2003. Vol. 52. N 4. P. 775–786.
27. Goda H., Sawa S., Asami T., Fujioka S., Shimada Y., Yoshida S. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2004. Vol. 134. N 4. P. 1555–1573.
28. Nakabayashi K., Okamoto M., Koshiba T., Kamiya Y., Nambara E. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed // *Plant J.* 2005. Vol. 41. N 5. P. 697–709.
29. Reeves W.M., Lynch T.J., Mobin R., Finkelstein R.R. Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors // *Plant Mol. Biol.* 2011. Vol. 75. N 4–5. P. 347–363.

Поступила в редакцию 25.08.2021

После доработки 19.10.2021

Принята в печать 27.10.2021

RESEARCH ARTICLE

The effect of phytohormones on the expression of USP encoding genes in *Arabidopsis thaliana* seedlings

D.S. Gorshkova^{1, 2, *} , E.S. Pojidaeva² 

¹*Department of Plant Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

²*Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya st. 35, Moscow, 127276, Russia*

**e-mail: dsgorshkova@yandex.ru*

Universal stress proteins (USP) are potentially involved in the processes that control plant morphogenesis, in which phytohormones play an important role. In this study, we searched for the genes of *Arabidopsis thaliana* USP that modulate their expression in response to the action of phytohormones. Fifteen USP genes have been identified whose expression is differently regulated by two or more phytohormones. Moreover, the accumulation of transcripts of the most studied genes was observed under the action of hormones involved in the formation of plant resistance to stress – abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate. At the same time, auxins and gibberellins, hormones that regulate plant growth, suppressed the expression of the studied USP genes. The obtained results revealed potential genes of USP, whose functional activity may be directly or indirectly associated with phytohormone-dependent processes that ensure plant growth under normal and stress conditions.

Keywords: *Abscisic acid, auxins, gibberellins, methyl jasmonate, universal stress proteins, ethylene, Arabidopsis thaliana, GRUSP*

Funding: The research was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 19-34-90017.

Сведения об авторах

Горшкова Дарья Сергеевна – аспирант, мл. науч. сотр. кафедры физиологии растений биологического факультета МГУ, мл. науч. сотр. лаборатории экспрессии генома Института физиологии растений РАН. Тел.: 8-499-678-54-25; e-mail: dsgorshkova@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1663-2710>

Пожидова Елена Станиславовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экспрессии генома Института физиологии растений РАН. Тел.: 8-499-678-54-25; e-mail: alenapoj@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5106-5707>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.085.23

Морфофункциональная характеристика фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы кожи человека**О.С. Роговая¹ , А.О. Зупник² , Л.Ш. Измайлова¹ , Е.А. Воротеляк¹ **

¹Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Фибробласты дермы являются неоднородной популяцией — среди них выделяют несколько субпопуляций, отличающихся происхождением, анатомической региональной специфичностью и расположением в толще дермы. Мы исследовали некоторые фенотипические и функциональные особенности фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы кожи человека. Выявлено, что эффективность выделения популяции ретикулярных фибробластов из первичной культуры увеличивается при снижении уровня кислорода до 5%. Морфометрический анализ культивированных фибробластов изученных популяций, сравнение силы и скорости контракции коллагенового геля и данные об уровнях экспрессии CD90 и CD73, полученные методами проточной цитофлуориметрии, показали существенные различия фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы человека височной области.

Ключевые слова: кожа человека, дерма, культивирование клеток, фибробласты, ретикулярные фибробласты, папиллярные фибробласты, контракция коллагенового геля

Кожный покров человека изучают уже на протяжении многих десятков лет, а фибробласты дермы — один из наиболее описанных типов клеток человека. При этом мы до сих пор гораздо лучше представляем функции дермы, чем понимаем механизмы, с помощью которых эта уникальная постоянно самообновляющаяся ткань их осуществляет. Последние несколько лет в связи с появлением новых методов исследований и новых данных о гетерогенном происхождении дермальных фибробластов интерес к ним снова растет [1–3].

Известно, что фибробласты дермы не являются однородной популяцией, в ней выделяют несколько субпопуляций, отличающихся расположением в толще дермы. В папиллярном слое, расположенном непосредственно под эпидермисом, преобладают фибробласты с более высокой ферментативной активностью, чем у клеток, расположенных в более глубоком ретикулярном слое [4]. Различия между папиллярными и ретикулярными субпопуляциями наблюдаются как *in vivo*, так и *in vitro* и выражаются в разном строении внеклеточного матрикса, а также в экспрессии клетками разных маркеров. Выделяют от трех до пяти субпопуляций фибробластов дермы с уникальным фенотипом [5–7].

Недавно было показано, что дермальные фибробласты млекопитающих имеют различное происхождение, которое прослеживается на ранних

эмбриональных этапах развития плода и зависит от анатомического расположения дермы. В частности, у мыши фибробласты кожи лицевой части головы происходят из нервного гребня, тогда как те, что расположены на спине, происходят из дерматомиотома, а те, что внутри вентральной дермы, — из боковой пластинки мезодермы [8]. Для анализа неоднородности фибробластов дермы используют маркеры, позволяющие различать общие фибробласты-предшественники и фибробласты специфических субпопуляций [8, 9]. Важно отметить, что в процессе эмбрионального развития экспрессия маркеров, специфичных для одной популяции фибробластов, может снижаться, в то время как эти же маркеры могут начать экспрессироваться у другой субпопуляции на следующем этапе [10].

Фибробласты папиллярного слоя взрослой кожи сохраняют повышенную пролиферативную и синтетическую активность в культуре, они синтезируют больше протеогликанов, но меньше коллагена, чем фибробласты ретикулярного слоя [4, 11]. В культуре фибробласты папиллярного слоя имеют веретеновидную форму [6]. Большое влияние на морфофункциональные характеристики папиллярных фибробластов оказывает возраст — чем старше донор, тем меньшая доля клеток имеет высокий пролиферативный потенциал. Также с возрастом ослабевает их функция поддер-

жания ниши для кератиноцитов, формирующих новый эпидермис в момент эпителизации кожных ран. [1]. Фибробласты ретикулярного слоя в культуре обычно сильно распластаны и имеют звездчатую форму [12]. Кроме того, большинство из них экспрессируют гладкомышечный актин (α -SMA). Исследования показали, что в этой популяции повышена экспрессия генов, ответственных за подвижность и сокращение клеток [13].

На наш взгляд, очень интересна концепция анатомической региональной специфичности фибробластов. Даже фибробласты, которые имеют общее эмбриональное происхождение, могут демонстрировать гетерогенность, основанную на их анатомическом расположении и микроокружении [14]. Давно известно, что фибробласты из разных анатомических участков обладают уникальной метаболической активностью и по-разному взаимодействуют с эпителиальными клетками кожи, что они сохраняют «память» о своем положении в теле и остаются способными активировать этот регион-специфический фенотип даже при удалении из своей родной ниши [15, 16]. Изучение популяций фибробластов из разных анатомических участков расширит наши знания о сложности и гетерогенности популяций дермальных фибробластов. Мы исследовали особенности популяций ретикулярных и папиллярных фибробластов из височной области кожи человека.

Материалы и методы

Дермальные фибробласты получали из образцов кожи, полученных в ходе пластических операций от доноров в возрасте 50, 55 и 58 лет, с их информированного согласия, в «Национальном медицинском исследовательском центре радиологии радиологии» Минздрава России. Все манипуляции проводили в стерильных условиях: кожу промывали раствором Хенкса с 1 мкг/мл гентамицина, затем удаляли подкожную жировую клетчатку и отсекали скальпелем ретикулярный слой дермы от папиллярного таким образом, чтобы верхний слой был толщиной не более 0,5 мм. Ретикулярный слой измельчали ножницами до гомогенности, помещали в пробирку в 0,1% раствор коллагеназы I типа и оставляли в термостате при температуре 37 °C на 24 ч. От папиллярного слоя сначала при помощи 0,2%-ного раствора диспазы отделяли эпидермис по стандартной методике [17], а затем дерму ферментировали так же, как это описано выше для ретикулярного слоя дермы. После дезагрегации дермы коллагеназой полученную массу тщательно отмывали от фермента в фосфатно-солевом буфере DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), после каждой промывки центрифугируя при 1000 об./мин, процедуру промывки повторяли 5 раз. После последнего центрифугирования осадок, представляющий собой фибробласты и не полностью растворившиеся

волокна коллагена, ресуспендировали в культуральной среде: DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium; ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 1% глутамакса (Gibco, США), 100 ед./мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (Gibco, США), и без фильтрования высевали в культуральные чашки Петри (Corning, США). Первичную культуру помещали в мультигазовый инкубатор с функцией подавления уровня кислорода до 5% (SANYO, Япония).

Каждые 2–3 сут проводили смену культуральной среды или, при необходимости, пассирование клеток в соотношении 1:3 стандартным способом [18], промывая их раствором версена (ПанЭко, Россия), а затем дезагрегируя их 0,05%-ным раствором трипсина (Gibco, США).

Для морфометрического анализа субпопуляций ретикулярных и папиллярных фибробластов и измерения скорости их роста использовали культуру на четвертом пассаже. Клетки были посажены в культуральные чашки Петри диаметром 3 см² по 100 тыс. клеток в каждую. Наблюдения и съемку вели на инвертированном микроскопе (OLYMPUS-DP70, Япония) в течение 5 сут. Съемку каждой культуры клеток проводили ежедневно. Фотографии были обработаны в ImageJ.

Для приготовления геля использовали следующую смесь растворов: 665 мкл NaOH (0,34 н), 350 мкл Na₂CO₃ (9,5%), 1 мл десятикратной среды M199 (Gibco, США), 40 мкл глутамакса (Gibco, США), 200 мкл NEPES (Sigma, США) и 8 мл раствора коллагена I типа. В приготовленную смесь немедленно добавляли клеточную суспензию из расчета 150 тыс. клеток на 1 мл геля и быстро заливали его в лунки 24-луночного планшета по 400 мкл геля на лунку. После полного застывания геля в лунки вносили по 500 мкл культуральной среды и при помощи стерильной иглы отделяли гель от пластика, получая, таким образом, свободно плавающий гель. Культивирование проводили в условиях обычного CO₂-инкубатора с процентным содержанием CO₂, равным 5%, в течение 6 сут.

Измерительную фотосъемку для фиксации степени контракции геля проводили цифровой камерой ежедневно в течение 6 сут, изменение диаметра геля в лунках проводили на полученных фотографиях в программе ImageJ.

Иммуноцитохимическое окрашивание полученных культур клеток для выявления экспрессии специфических маркеров дермальных фибробластов проводили в 24-луночных культуральных планшетах. Клетки были посеяны в планшеты за сутки до окрашивания. Фиксацию клеток проводили 4%-ным раствором параформальдегида при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее образцы отмывали от фиксатора в растворе DPBS (3 раза по 5 мин), после чего начинали инкубацию

в растворе первичных антител к фибронектину, коллагену I типа, коллагену III типа и виментину. Антитела разводили в соответствии с рекомендациями производителя (таблица) блокирующим раствором состава: DPBS с содержанием сыворотки в концентрации 2% и Тритона X100 в концентрации 0,2%. Инкубацию клеток проводили в течение 10–12 ч при температуре +4 °С в условиях влажной камеры. После этого культуру клеток отмывали от несвязавшихся первичных антител раствором DPBS (3 раза по 10 мин), затем в течение 1 ч при комнатной температуре в условиях абсолютной темноты и влажной камеры образцы инкубировали в растворе вторых антител, конъюгированных с флуорофором. Антитела разводили в соответствии с рекомендациями производителя раствором DPBS (таблица). Перед анализом образцов с помощью флуоресцентного микроскопа клетки отмывали (3 раза по 5 мин) от несвязавшихся вторых антител, чтобы избежать фонового сигнала от флуорофора. Для визуализации ядер клеток проводили окрашивание ДНК-связывающимся красителем DAPI в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин.

Для проточной цитофлуориметрии готовили суспензию клеток с концентрацией не менее $1 \cdot 10^6$ клеток/мл. Клетки снимали с поверхности стандартным методом, производили подсчет в счетчике, отмывали суспензию клеток в DPBS, после чего ее центрифугировали при 1000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант сливали, а клеточный осадок ресуспендировали в блокирующем растворе до конечной концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток на 100 мкл. Окрашивание клеток проводили по рекомендованной производителями антител методике в пробирках Eppendorf. Клетки окрашивали антителами к антигенам CD90 и CD73 (таблица). Для настройки параметров анализа использовали соответствующие каждому маркеру изотип-контроли, а для исключения автофлуоресценции применяли неокрашенные клетки каждого типа. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Attune NxT (Thermo Fisher, США).

Клетки были выделены из кожи трех доноров одной возрастной группы и пола (см. начало «Материалов и методов»), все эксперименты

проводили в трех биологических повторах. Для морфометрического анализа съемку каждой культуры клеток проводили в 10 полях зрения (увеличение $\times 200$), всего было проанализировано 1240 клеток. Данные, полученные при обработке фотографий, анализировали в программах Prism 8 (США) и Microsoft Office Excel (США). Для сравнения независимых совокупностей в случаях отсутствия признаков нормального распределения данных использовался U-критерий Манна-Уитни. Для оценки величины контракции геля клетками эксперимент проводили в трех технических повторах, данные, полученные при обработке фотографий, анализировали в программе Microsoft Office Excel с использованием функции подсчета стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Пониженная концентрация O_2 способствует выживанию фибробластов ретикулярного слоя. Были получены популяции дермальных фибробластов человека из кожи височной области – зоны, где полностью отсутствуют волосы, а кожа отличается тонким слоем ретикулярной дермы и очень тонким и рыхлым слоем подкожной клетчатки. При этом выделение клеток из ретикулярного слоя дермы и культивирование первичной культуры в условиях CO_2 -инкубатора с уровнем CO_2 в камере для культивирования, равным 5%, отличалось низкой эффективностью: полученные после ферментирования единичные клетки плохо прикреплялись к пластику и в большинстве погибали. При культивировании первичной культуры клеток в атмосфере со сниженной до 5% концентрацией O_2 (при этом уровень CO_2 был, как в предыдущем варианте 5%) мы наблюдали медленную миграцию фибробластов ретикулярного слоя из частично дезагрегированной ферментами дермы в течение двух недель. При выделении тотальной популяции фибробластов, без разделения дермы на ретикулярный и папиллярный слои, клетки в первичной культуре прикрепляются к пластику и начинают пролиферировать независимо от уровня кислорода в CO_2 -инкубаторе, так же, как и фибробласты папиллярного слоя дермы.

Таблица

Перечень использованных антител

Название (антиген)	Конъюгат	Животное (Изотип)	Каталожный номер, фирма производитель	Разведение
CD90	PE-Cy5	Мышь (IgG1)	#555597, BD	1:20
CD73	FITC	Мышь (IgG1)	#561254, BD	1:20
Фибронектин	–	Кролик (IgG)	#ab2413, Abcam	1:1000
Коллаген I	–	Кролик (IgG)	#ab21286, Abcam	1:250
Коллаген III	–	Кролик (IgG)	#ab7778, Abcam	1:1000
Виментин	–	Мышь (IgG1)	#ab8978, Abcam	1:250
Вторые детектирующие (к IgG мыши)	Alexa 488	Козел (IgG)	#ab150113, Abcam	1:1000
Вторые детектирующие (к IgG кролика)	Alexa 488	Козел (IgG)	#ab150077, Abcam	1:1000

В результате при культивировании со сниженной концентрацией O_2 культуры ретикулярных фибробластов образовали конфлюэнтный слой через три недели после выделения. Первичные фибробласты папиллярного слоя, так же, как и тотальная культура фибробластов от того же донора в условиях сниженного процента O_2 , образовывали плотный монослой уже через 3–4 сут после выделения. Стоит отметить, что при длительном культивировании различия между фибробластами разных популяций исчезают, что соответствует данным литературы [13], и тогда сравнение данных субпопуляций не имеет смысла. В нашей работе сравнение двух популяций проводили в культурах клеток не позднее шестого пассажа. Обе популяции фибробластов были положительны по основным специфическим для данного типа клеток маркерам: фибронектин, коллагены I и III типов, виментин.

Морфология и динамика роста ретикулярных и папиллярных фибробластов. Было проведено сравнение морфометрических параметров двух популяций фибробластов, полученных из височной области кожи. На прижизненных фото видно,

что папиллярные фибробласты имеют типичную веретеновидную форму, они более вытянуты и обычно имеют по 2–3 отростка (рис. 1А) Ретикулярные фибробласты в большинстве имеют вытянуто-звездчатую форму и более распластаны по субстрату (рис. 1Б). Были измерены площади клеток разных популяций. Здесь и далее, под термином «площадь клетки» мы будем подразумевать площадь культурального субстрата, который покрывает растущая на нем клетка. Сравнивали площади клеток в разреженных культурах (рис. 1В). На фотографии видно, что ретикулярные фибробласты отличаются от папиллярных формой и количеством отростков. Статистический анализ показал, что различия между средней общей площадью клеток в группах значимы, хотя и невелики. В тех же группах клеток было измерено ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО). Оказалось, что ЯЦО папиллярных фибробластов достоверно выше (0,085), чем у ретикулярных (0,066) (рис. 1Г, Д). Это подтверждает данные литературы о том, что папиллярные фибробласты обладают более высокой синтетической активностью, чем ретикулярные.

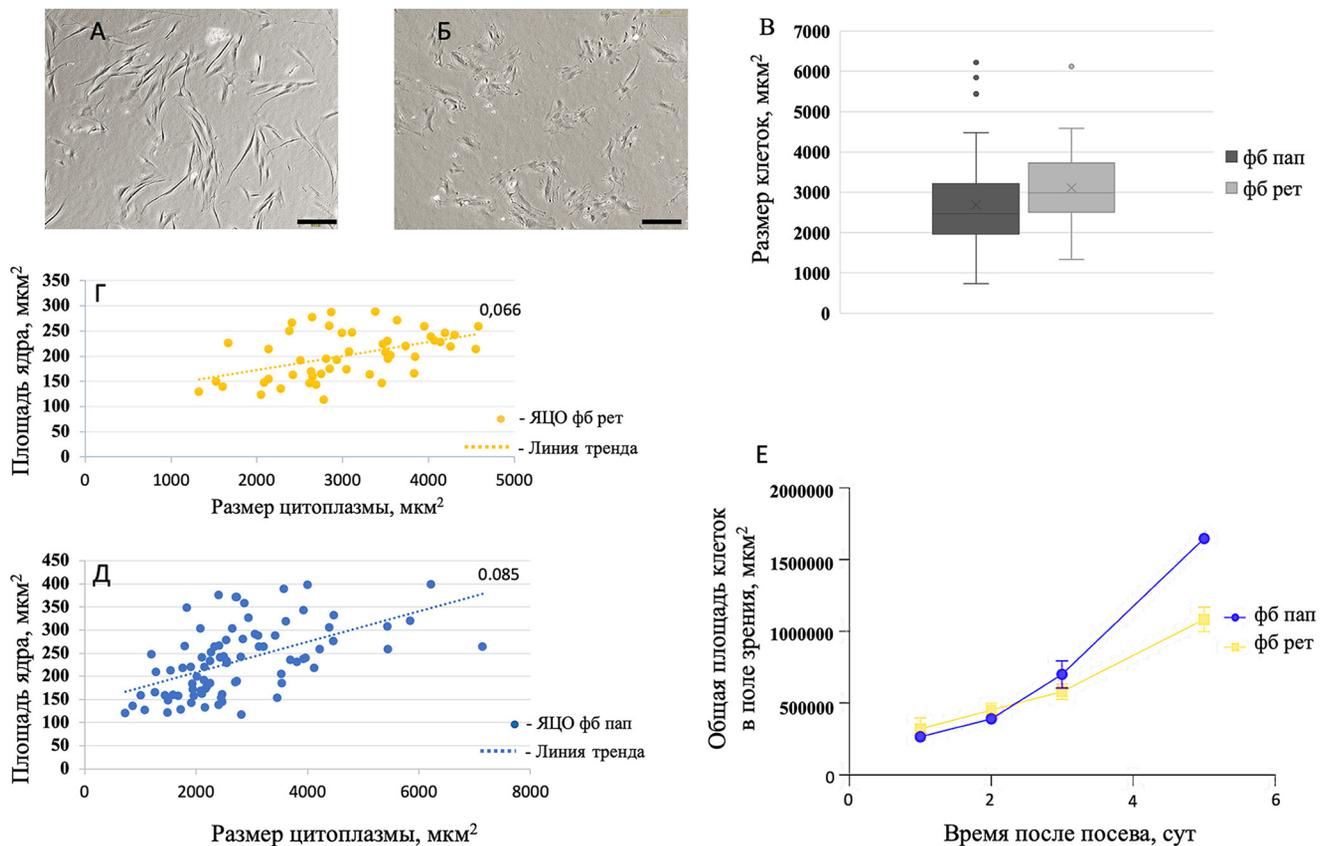


Рис. 1. Особенности морфологии популяций дермальных фибробластов в культуре. На фото папиллярные (А) и ретикулярные (Б) фибробласты четвертого пассажа, фазовый контраст. Результат сравнения площадей клеток культивируемых папиллярных (фб пап) и ретикулярных (фб рет) фибробластов (В), статистически значимое различие по U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$). Ядерно-цитоплазматические отношения (ЯЦО) двух популяций фибробластов представлены в виде точечных диаграмм, для ретикулярных фибробластов его среднее значение 0,066 (Г), для папиллярных – 0,085 (Д). Скорость образования конфлюэнтного слоя на культуральной поверхности ретикулярными (фб рет) и папиллярными (фб пап) фибробластами, данные на графике представлены как среднее \pm среднеквадратичное отклонение (Е).

Для измерения скорости роста субпопуляций мы оценивали изменение плотности культуры в полях зрения, вплоть до формирования конфлюэнтного монослоя, в случае папиллярных фибробластов – на 5 сут. Скорость роста культуры папиллярных фибробластов была выше, чем у ретикулярных фибробластов (рис. 1Е), при этом в монослое папиллярные клетки достигают более высокой плотности, чем ретикулярные, видимо, отчасти потому, что контактное ингибирование происходит не в полной мере [19, 20].

Сократительная способность фибробластов ретикулярного и папиллярного слоя. Для изучения со-

кратительной способности полученных фибробластов мы использовали стандартную модель контракции флолирующего трехмерного коллагенового геля [21]. Для того, чтобы оценить вклад каждой из исследуемых популяций в процесс сжатия геля, мы исследовали поведение культуры тотальной популяции фибробластов, выделенных из дермы височной области кожи, на раннем (4) и позднем (34) пассажах, а также отдельно – папиллярные и ретикулярные фибробласты четвертого пассажа того же донора. В результате все клетки показали способность к сжатию коллагенового геля в разной степени (рис. 2А). По результатам,

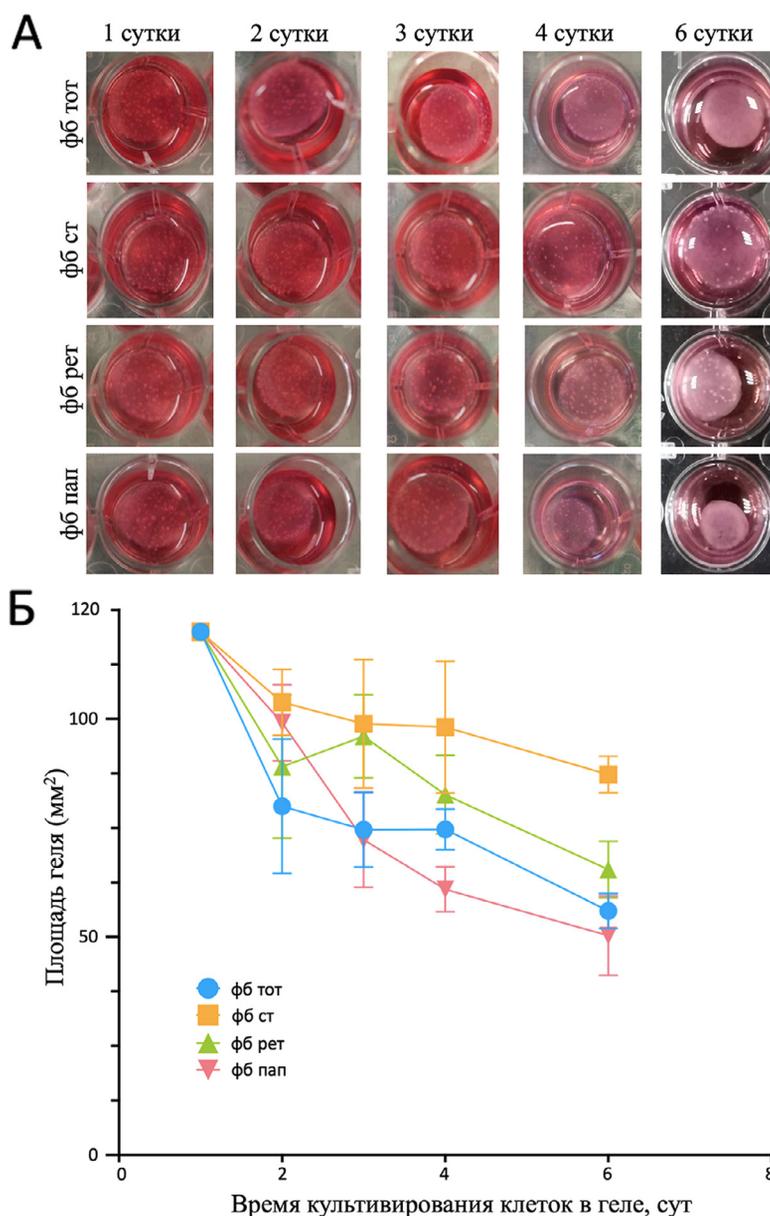


Рис. 2. Сократительная способность фибробластов в модели контракции коллагенового геля. На коллаже из прижизненных фотографий (А) показано, как в результате контракции уменьшается площадь коллагенового геля при культивировании в нем фибробластов в течение 6 сут; сверху вниз на фото: тотальные культуры четвертого пассажа (fb tot), стареющие культуры фибробластов поздних пассажей (fb ст), папиллярные фибробласты пятого пассажа (fb пап) и ретикулярные фибробласты (fb рет) пятого пассажа. Сильнее всего сократировал гель с тотальной популяцией фибробластов четвертого пассажа (fb tot) и с фибробластами папиллярного слоя пятого пассажа (fb пап), слабее всего – гель со стареющей культурой фибробластов 34 пассажа (fb ст), на графике представлены данные трех биологических повторов как среднее \pm среднеквадратичное отклонение (Б).

представленным на графике, видно, что самой интенсивной сократительной способностью обладают папиллярные фибробласты и фибробласты тотальной популяции раннего пассажа, при этом ретикулярные фибробласты активно сокращаются только в первые сутки, а слабее всего сократились фибробласты стареющей культуры 34-го пассажа (рис. 2Б). Таким образом, можно сделать вывод, что сила сжатия геля культурой фибробластов кожи височной области напрямую зависит репликативного возраста культуры.

Особенности экспрессии поверхностных маркеров фибробластами ретикулярного и папиллярного слоя. Имеются данные, что ретикулярные и папиллярные фибробласты сильно различаются по уровню экспрессии некоторых маркеров. Группа исследователей использовала экспрессию CD90 для разделения субпопуляций фибробластов по своей методике, так как по их данным он не экспрессируется в популяции фибробластов, выделяемых из папиллярного слоя [5]. Мы использовали этот маркер для характеристики полученных популяций. Кроме того, мы исследовали уровень экспрессии CD73 (экто-5'-нуклеотидаза – NT5E). Молекула CD73 совместно с CD39 участвует в генерации внеклеточного аденозина. Образование внеклеточных пуриновых нуклеозидов играет роль в регуляции воспаления и тканевого гомеостаза [22]. Отличия в экспрессии аденозина могут свидетельствовать о разном статусе клеток. В результате было показано, что различные популяции фибробластов на 4–6 пассаже, как тотальная фракция фибробластов дермы, так и отдельно фибробласты папиллярного и ретикулярного слоев,

выделенные из дермы височной области кожи человека, положительны по выбранным нами маркерам. Кроме того, было показано, что при длительном культивировании до 35 пассажа фибробласты экспрессировали CD90 и CD73. Чтобы определить, имеются ли различия по экспрессии данных маркеров между исследуемыми популяциями фибробластов, оценили интенсивность медианной флуоресценции (MFI), данные представлены на диаграмме (рис. 3).

Выяснилось, что MFI CD90 выше у ретикулярных фибробластов, чем у папиллярных, в культурах 6 пассажа. Это особенно интересно в связи с недавно вышедшей работой, в которой именно анализ интенсивности экспрессии данного маркера позволил исследователям выделить отдельную популяцию мультипотентных стромальных клеток (МСК), расположенную в основании крипт толстой кишки [23]. Авторы показали, что клетки с высокой (CD90-high) и со средней (CD90-medium) экспрессией данного маркера выполняют разные роли в поддержании гомеостаза эпителия кишечника. Возможно, для исследования фибробластов дермы применимы схожие критерии. Исходя из полученных результатов, мы можем предположить, что CD73 можно использовать для определения ретикулярных и папиллярных субпопуляций фибробластов, так как различия в уровнях экспрессии CD73 в папиллярных и ретикулярных фибробластах аналогичны различиям в уровнях экспрессии CD90. Также мы наблюдали значительное снижение количества CD90 и CD73 в фибробластах на поздних пассажах (рис. 2Б).

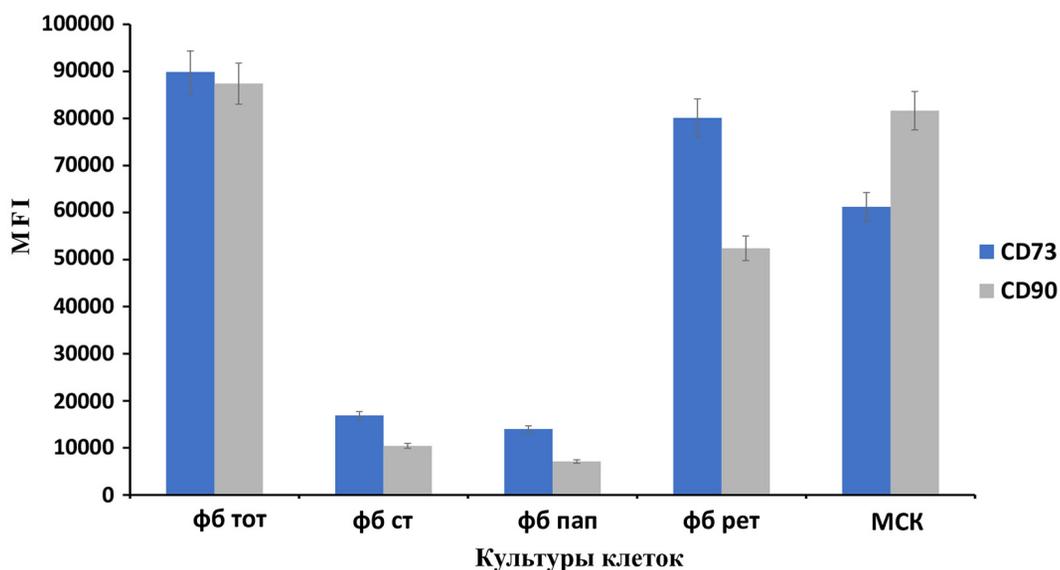


Рис. 3. Результаты проточной цитофлуориметрии культур фибробластов. Все исследуемые популяции фибробластов экспрессировали маркеры CD90 и CD73. Результаты измерения уровней MFI в исследуемых культурах фибробластов показаны на диаграмме, данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение трех биологических повторов. По оси абсцисс слева направо исследуемые культуры: тотальная фракция (fb tot), стареющая культура фибробластов (fb ст) 34-го пассажа, папиллярные фибробласты (fb пап) и ретикулярные фибробласты (fb рет). В качестве положительного контроля специфичности антител были использованы мультипотентные стромальные клетки (МСК).

Таким образом, было показано, что подавление уровня кислорода в атмосфере при культивировании первично выделенных фибробластов кожи человека височной области значительно повышает эффективность выделения жизнеспособных клеток дермы ретикулярного слоя. Скорость роста при культивировании выше у папиллярных фибробластов. Исходя из этого, можно предположить, что при выделении тотальной фракции фибробластов папиллярные фибробласты получают преимущества в силу своей большей активности. Ретикулярные и папиллярные фибробласты из кожи человека височной области ранних пассажей имеют ряд морфологических отличий, что выражается в разной форме клеток и в более высоком ЯЦО у папиллярных фибробластов. Также папиллярные фибробласты показали более высокую способность к сжатию коллагенового геля. Все ис-

следованные нами культуры фибробластов, включая фибробласты поздних пассажей, экспрессируют характерные маркеры фибробластов и маркеры стромальных клеток CD90 и CD73. Однако интенсивность экспрессии CD90 и CD73 в популяции ретикулярных фибробластов выше, чем в популяции папиллярных. При этом самый высокий уровень экспрессии наблюдали в фибробластах ранних пассажей, а самый низкий в клетках стареющей культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-30015). Исследование проведено с соблюдением этических норм работы с культурами клеток человека и одобрено комиссией по биоэтике Института биологии развития имени Н.К. Кольцова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Regeneration of dermis: scarring and cells involved // *Cells*. 2019. Vol. 8. N 6: 607.
2. desJardins-Park H.E., Chinta M.S., Foster D.S., Borrelli M.R., Shen A.H., Wan D.C., Longaker M.T. Fibroblast heterogeneity in and its implications for plastic and reconstructive surgery: A basic science review // *Plast. Reconstr. Surg.* 2020. Vol. 8. N 6: e2927.
3. Zou M.L., Teng Y.Y., Wu J.J., Liu S.Y., Tang X.Y., Jia Y., Chen Z.H., Zhang K.W., Sun Z.L., Li X., Ye J.X., Xu R.S., Yuan F.L. Fibroblasts: Heterogeneous cells with potential in regenerative therapy for scarless wound healing // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 20. N 9: 713605.
4. Harper R.A., Grove G. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential in vitro // *Science*. 1979. Vol. 204. N 4392. P. 526–527.
5. Korosec A., Frech S., Gesslbauer B., Vierhapper M., Radtke C., Petzelbauer P. Lineage identity and location within the dermis determine the function of papillary and reticular fibroblasts in human skin // *J. Invest. Dermatol.* 2019. Vol. 139. N 2. P. 342–351.
6. Philippeos C., Telerman S.B., Oulès B., Pisco A.O., Shaw T.J., Elgueta R. Spatial and single-cell transcriptional profiling identifies functionally distinct human dermal fibroblast subpopulations // *J. Invest. Dermatol.* 2018. Vol. 138. N 4. P. 811–825.
7. Haydont V., Neiveyans V., Zucchi H., Fortunel N.O., Asselineau D. Genome-wide profiling of adult human papillary and reticular fibroblasts identifies ACAN, Col XI α 1, and PSG1 as general biomarkers of dermis ageing, and KANK4 as an exemplary effector of papillary fibroblast ageing, related to contractility // *Mech. Ageing Dev.* 2019. Vol. 177. P. 157–181.
8. Griffin M.F., desJardins-Park H.E., Mascharak S., Borrelli M.R., Longaker M.T. Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis // *Dis. Model. Mech.* 2020. Vol. 13. N 6: dmm044164.
9. Driskell R.R., Lichtenberger B.M., Hoste E., Kretzschmar K., Simons B.D., Charalambous M., Ferron S.R., Haurault Y., Pavlovic G., Ferguson-Smith A.C., Watt F.M. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair // *Nature*. 2013. Vol. 504. N 7479. P. 277–281.
10. Driskell R.R., Watt F.M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin // *Trends Cell Biol.* 2015. Vol. 25. N 2. P. 92–99.
11. Schönherr E., Beavan L.A., Hausser H., Kresse H., Culp L.A. Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro // *Biochem. J.* 1993. Vol. 290. Pt. 3. P. 893–899.
12. Ambler C. A., Watt F.M. Adult epidermal Notch activity induces dermal accumulation of T cells and neural crest derivatives through upregulation of jagged 1 // *Development*. Vol. 137. N 21. P. 3569–3579.
13. Janson D.G., Saintigny G., van Adrichem A., Mahé C., El Ghalbzouri A. Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts // *J. Invest. Dermatol.* 2012. Vol. 132. N 11. P. 2565–2572.
14. Rinn J.L., Bondre C., Gladstone, H.B., Brown P.O., Chang, H.Y. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs // *PLoS Genet.* Vol. 2. N 7: e119.
15. Jahoda C.A., Horne K.A., Oliver R.F. Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells // *Nature*. 1984. Vol. 311. N 5986. P. 560–562.
16. Jahoda C.A., Reynolds A.J., Oliver R.F. Induction of hair growth in ear wounds by cultured dermal papilla cells // *J. Invest. Dermatol.* 1993. Vol. 101. N 4. P. 584–590.
17. Henrot P., Laurent P., Levionnois E., Leleu D., Pain C., Truchetet M.E., Cario M.A. Method for isolating and culturing skin cells: application to endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes from punch biopsies in systemic sclerosis skin // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 7. N 11: 566607.
18. Фреши Р.Ян. Культура животных клеток: практическое руководство. Москва: Бином. Лаб. знаний, 2010. 691 с.
19. Schafer I.A., Pandey M., Ferguson R., Davis B.R. Comparative observation of fibroblasts derived from the pap-

illary and reticular dermis of infants and adults: growth kinetics, packing density at confluence and surface morphology // *Mech. Ageing Dev.* 1985. Vol. 31. N 3. P. 275–293.

20. *Sorrell J.M., Baber M.A., Caplan A.I.* Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes // *J. Cell. Physiol.* 2004. Vol. 200. N 1. P. 134–145.

21. *Kanta J.* Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior // *Cell Adh. Migr.* 2015. Vol. 9. N 4. P. 308–316.

22. *Antonoli L., Blandizzi C., Pacher P., Haskó G.* Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. Vol. 13 N 12. P. 842–857.

23. *Wu N., Sun H., Zhao X., et al.* MAP3K2-regulated intestinal stromal cells define a distinct stem cell niche // *Nature.* 2021. Vol. 592. N 7855. P. 606–610.

Поступила в редакцию 14.09.2021

После доработки 17.10.2021

Принята в печать 29.10.2021

RESEARCH ARTICLE

Morphofunctional characteristics of fibroblasts of the papillary and reticular layers of the dermis of human skin

O.S. Rogovaya¹ , A.O. Zupnik² , L.Sh. Izmailova¹ , E.A. Vorotelyak¹ 

¹*N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova 26 Moscow, 119334, Russia;*

²*Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

*e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Fibroblasts of the dermis are a heterogeneous population – among them there are several subpopulations that differ in origin, anatomical regional specificity and location in the thickness of the dermis. We investigated some phenotypic and functional features of fibroblasts of the papillary and reticular dermis of human skin. It was found that the introduction of reticular fibroblasts into the primary culture with an oxygen level reduced to 5% increases the efficiency of obtaining this population of fibroblasts. Morphometric analysis of cultured fibroblasts of the studied populations, comparison of the strength and rate of collagen gel contraction, and data on the expression levels of CD90 and CD73 obtained by flow cytometry showed significant differences in fibroblasts of the papillary and reticular layers of the human dermis of the temporal region.

Keywords: *human skin, dermis, cultivation of cells, fibroblasts, reticular fibroblasts, papillary fibroblasts, collagen gel contraction*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number № 21-74-30015.

Сведения об авторах

Роговая Ольга Сергеевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: rogovaya26f@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0003-4251-9372>

Зупник Андрей Олегович – магистрант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-94; e-mail: zu.andrey2011@gmail.com; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-8313-4095>

Измайлова Любовь Шамилевна – аспирант лаборатории клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: luba.ranaway-94@yandex.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7739-9369>

Воротеляк Екатерина Андреевна – докт. биол. наук, чл.-корр. РАН, зав. лабораторией клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: vorotelyak@yandex.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-5405-0212>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 631.46:579.873

Актинобиота ризосферы трансгенных растений табака с повышенной солеустойчивостью**И.Г. Широких* , Я.И. Назарова ***Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого,
Россия, 610007, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а***e-mail: irgenal@mail.ru*

Оценка безопасности генетически модифицированных растений для почвенного микробного сообщества и окружающей среды в целом – одна из серьезных проблем сегодняшнего дня в связи с постоянно увеличивающимся разнообразием генов, вовлекаемых в конструирование генотипов сельскохозяйственных культур, устойчивых к эдафическим стрессам. В качестве модели в работе использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L.) с геном холиноксидазы (*codA*) из *Arthrobacter globiformis*, отвечающим за синтез ГБ – совместимого осмолита, способствующего стабилизации клеток при солевом стрессе. Растения исходного сорта Самсун и трансгенной линии CodA 38 выращивали в горшечной культуре на обычном почвенном фоне и в условиях солевого стресса, вызванного 150 мМ NaCl. Сравнивали численность, разнообразие и структуру комплексов актиномицетов на родовом и видовом (род *Streptomyces*) уровне, используя параметрический и ранговый методы статистического анализа. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимых ($p=0,95$) изменений в численности и таксономической структуре актинобиоты, распространении стрептомицетов-антагонистов фитопатогенных грибов и бактерий, стрептомицетов-целлюлозолитиков в ризосфере растений-трансформантов с усиленной генно-инженерным путем устойчивостью к солевому стрессу. Сделано заключение о необходимости продолжения исследований специфических ответов со стороны почвенных и ризосферных микроорганизмов на различные категории генетически модифицированных растений.

Ключевые слова: засоление почвы, растение-трансформант, ген холиноксидазы, *Streptomyces*, антагонисты, целлюлозолитики

Засоление почв охватывает около 10% поверхности континентов и является серьезной проблемой из-за неблагоприятного воздействия на продуктивность и устойчивость сельского хозяйства. Скопление значительного количества сульфатов, хлоридов, карбонатов в почвенных слоях, доступных для проникновения корневой системы, угнетает рост и жизнеспособность растений. Засолению подвержены почвы разного генезиса и свойств, в любых климатических условиях, поскольку это процесс динамический и является результатом действия как природных, так и антропогенных факторов. Наиболее характерно это явление для аридной климатической зоны, с земледелием на орошаемых почвах. По некоторым оценкам около 20% (45 млн га) орошаемых земель, на которых производится треть мирового продовольствия, подвержены воздействию соли [1]. Объем сельскохозяйственных земель в мире, ежегодно уничтожаемых накоплением соли, оценивается в 10 млн га [2]. По прогнозам, подверженные засолению площади будут неизбежно возрастать из-за связанного с изменением климата

повышения уровня мирового океана (воздействие на прибрежные районы) и среднегодовых показателей температуры (увеличение объемов испарения) [3, 4].

С увеличением площади засоленных территорий связана актуальность создания солеустойчивых растений. Применение генно-инженерных технологий рассматривают сегодня как одну из действенных стратегий усиления устойчивости сельскохозяйственных культур к солевому стрессу [5, 6]. Одной из основных систем защиты от повышенной концентрации солей в среде, как у бактерий, так и у растений, является накопление в клетках осмопротекторных соединений – осмолитов. К числу эффективных осмолитов относят глицинбетаин (ГБ), источником которого служит холин [7]. Рядом авторов было показано, что суперэкспрессия гена холиноксидазы (*codA*) из типичной почвенной бактерии *Arthrobacter globiformis* в трансгенных растениях приводит к усилению устойчивости к соли в связи с накоплением в тканях ГБ [8–10]. Вместе с тем, генно-инженерное вмешательство в геном растения чревато такими

перестройками метаболизма, которые могут сказаться на его взаимодействии с почвенными микроорганизмами [11]. В связи с этим необходима оценка экологической безопасности для почвенного микробиома трансгенных растений с усиленной солеустойчивостью.

Почвенные актиномицеты синтезируют широкий спектр физиологически активных соединений (антибиотики, фитогормоны, сидерофоры, витамины и т.д.), что позволяет им эффективно взаимодействовать с растением, а также контролировать численность фитопатогенных микроорганизмов [12, 13]. По сравнению с другими группами почвенных микроорганизмов, среди актиномицетов наиболее велика доля стимуляторов роста растений (Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB) [14]. Благодаря продукции экзогидролаз, актиномицеты утилизируют в почвах разнообразные растительные полимеры, обеспечивают растениям благоприятные условия существования, играют ведущую роль в регуляции почвенного гомеостаза и реализации почвой своих экологических функций [12]. В связи с этим актиномицеты представляют очевидный интерес в качестве модельной биоиндикационной группы микроорганизмов.

Целью работы стало изучение влияния растений-трансформантов по гену синтеза ГБ (*codA*) на актиномицетный комплекс в ризосфере табака, выращенного в обычных эдафических условиях и при солевом стрессе.

Материалы и методы

В работе использовали табак обыкновенный (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун и полученную на его основе генетически модифицированную линию CodA 38. Пробиорочные растения с молекулярно подтвержденной экспрессией гена *codA* из *A. globiformis* были любезно предоставлены Г.Н. Ралдугиной (Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Россия). Растения микроразмножили на среде Мурасиге-Скуга без добавления гормонов и витаминов [15]. При достижении возраста 6 нед. (хорошо сформированная корневая система) растения высаживали по одному в вегетационные сосуды (1 л), заполненные универсальным почвогрунтом (Гера, Keva Bioterra, Россия) со следующими характеристиками: $C_{\text{общ}}$ – 4,8%; P_2O_5 – 130,43 мг-экв/100 г; K_2O – 213,47 мг-экв/100 г; Ca – 20,3 мг-экв/100 г; Mg – 5,4 мг-экв/100 г; $pH_{\text{сол}}$ 7,6.

Растения выращивали на двух эдафических фонах: 0 – контроль; NaCl – солевой стресс, вызванный проливом воздушно-сухого почвогрунта 150 мМ раствором NaCl в объеме, рассчитанном на полную влагоемкость ($54 \pm 1,5\%$) субстрата, которую определяли согласно ранее опубликованной методике [16]. В контроле для пролива использовали в том же объеме воду, очищенную

фильтрованием через бытовой фильтр Аквафор. При выборе солевой нагрузки на почву руководствовались данными работы Цяо и соавт. [17]. На том и другом фоне сравниваемые генотипы были представлены шестью клонами каждый.

Растения в возрасте 10 нед. извлекали из сосудов, освобождали интенсивным отряхиванием корневую систему от почвы и объединяли по вариантам. Из каждого объединенного образца отбирали по две навески (2 г) корней с почвой, оставшейся после отряхивания (ризосфера). Отдельно анализировали исходный почвогрунт, свободный от корней. Все образцы перед посевом прогревали в течение 1 ч при 100 °С для ограничения роста немиецелиальных бактерий, гомогенизировали в ступке и готовили серию разведений для посева. Выделяли и выявляли структуру комплексов актиномицетов на агаре с пропионатом натрия (г/л): KH_2PO_4 – 0,5, Na_2HPO_4 – 0,7, KNO_3 – 0,1, NaCl – 0,3, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1, $CaCO_3$ – 0,02, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,0002, $MnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,00002, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,00018, пропионат натрия – 0,2, агар – 20; стрептомицетов – на казеин-глицериновом агаре (КГА) (г/л): гидролизат казеина с дрожжевым экстрактом – 0,3; глицерин – 10 мл; KNO_3 – 2; K_2HPO_4 – 2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,05; $FeSO_4 \times H_2O$ – 0,01; $CaCO_3$ – 0,02; NaCl – 2; агар – 20. Колонии учитывали дифференцированно по морфологическим типам. Доминирующие на чашках колонии выделяли в чистую культуру, фиксируя их принадлежность к определенному образцу. Для каждого образца составляли выборки не менее 15 изолятов. Таксономическое положение изолятов определяли, используя фенотипические признаки [18] и, выборочно, результаты анализа фрагмента 16S рРНК. Первичный сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей и последовательностей из базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Парное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы LALIGN (https://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html).

Дополнительно изучали антагонистические свойства и целлюлозолитическую активность [19] выделенных культур. Характеризуя структуру ризосферных комплексов актиномицетов, использовали показатели долевого участия и частоты встречаемости таксона, а также относительное обилие в комплексе стрептомицетов – антагонистов и целлюлозолитиков (%).

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами непараметрического и рангового анализа (U-критерий Манна-Уитни). Подсчет средних значений и стандартных отклонений выполняли в программе Microsoft Excel. Попарное сравнение независимых выборок осуществляли с помощью программы PAST Version 4.06.

Результаты и обсуждение

Доля актиномицетов в прокариотном комплексе ризосферы, в зависимости от генотипа табака и почвенного фона, изменялась от 1,6 до 6,0%, тогда как в почве, лишенной корней, составляла 3,78% (табл. 1). У растений-трансформантов показатели долевого участия актиномицетов в прокариотном комплексе были в 2,8–3,5 раза выше, чем у растений исходного сорта. В условиях солевого стресса доля мицелиальных прокариот от общего количества бактерий была выше, чем у растений, выращенных в обычных условиях. В ответ на засоление показатель в большей степени увеличивался у растений исходного сорта (на 0,52%), чем в ризосфере трансформантов (на 0,37%).

Таксономическое разнообразие актинобиоты, оцениваемое с помощью индексов Шеннона, в ризосфере трансформантов было ниже ($H = 0,6–0,8$), чем у исходного сорта и во внекорневой почве ($H = 1,1 \pm 0,18$). Наиболее значительно снизился индекс разнообразия в ризосфере линии CodA 38, выращенной в условиях солевого стресса.

Сравнение исходного сорта и трансгенной линии CodA 38 по таксономической структуре ризосферного комплекса, выявляемого на среде с пропионатом натрия, показало, что на корнях табака в различном соотношении и с различной частотой встречались представители родов *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptoverticillium* и олигоспоровые формы актиномицетов. По показателю относительного обилия в ризосфере доминировали стрептомицеты (от 53,9 до 91,5%), тогда как во внекорневой почве – микромоноспоры (от 40,9 до 73,0%). В ризосфере исходных растений микромоноспоры входили, наряду со стрептомицетами, в число доминирующих родов, а в ризосфере трансформантов – нет. Помимо микромоноспор, в актиномицетном комплексе линии CodA 38 значительно ниже, чем

у исходного сорта, были показатели относительного обилия олигоспоровых форм и стрептоспорангиумов.

Существенных перестроек под влиянием солевого стресса у сравниваемых генотипов табака в таксономической структуре ризосферной актинобиоты на уровне родов не выявлено. Вместе с тем, на корнях растений, выращенных на разных почвенных фонах, были отмечены различия в видовой структуре рода *Streptomyces*. К роду *Streptomyces* относили культуры, при микроскопии которых обнаруживали типичные морфологические признаки: нефрагментированный субстратный и воздушный мицелий, длинные цепочки спор на воздушном мицелии и отсутствие спор на субстратном мицелии. Выборочный анализ фрагментов гена 16S рРНК у изолятов данного морфотипа подтвердил, что выделенные культуры являются представителями рода *Streptomyces* семейства Streptomycetaceae порядка Streptomycetales класса Actinobacteria. Однако видовая идентификация культур на основе сиквенсов фрагмента гена 16s рРНК оказалась невозможной, поскольку все нуклеотидные фрагменты, выданные BLAST для исследуемых штаммов, более чем на 98% соответствовали введенным последовательностям. Очевидно, для идентификации штаммов *Streptomyces* на видовом уровне в большинстве случаев необходим мультилокусный или даже полногеномный анализ, ценность которых была продемонстрирована в работах последнего времени [20, 21]. В связи с этим, помимо генетических данных, учитывали фенотипические признаки изолятов, такие как цвет воздушного и субстратного мицелия на среде Гаузе 1 [18]. Это позволило в ризосферных комплексах стрептомицетов определить доленое участие видов, относимых к отдельным цветовым секциям и сериям.

В ризосфере растений исходного сорта, выращенных в обычных условиях и на фоне засоления, различия в видовой структуре стрептомицетов

Таблица 1

Численность и структура комплексов актиномицетов в зависимости от фона почвы и генотипа растения

Показатель	Ризосфера табака				Почва вне ризосферы
	Самсун		CodA 38		
	0	NaCl	0	NaCl	
Общая численность прокариот, вырастающих на КГА, млн КОЕ/г	16,4 ± 5,52	14,8 ± 1,62	19,0 ± 5,11	13,8 ± 4,61	9,8 ± 3,16
Доля актиномицетов в прокариотном комплексе, %	1,61	2,13	5,63	6,0	3,78
Количество секций и серий рода <i>Streptomyces</i>	6	7	6	6	5
Количество родов, выделяемых на среде с пропионатом натрия	5	5	5	5	5
Индекс Шеннона (H)	1,1 ± 0,19	1,1 ± 0,17	0,8 ± 0,16	0,6 ± 0,19	1,1 ± 0,18
Относительное обилие в комплексе представителей родов, %:					
<i>Streptomyces</i>	53,9–69,7	67,2–68,2	67,7–90,3	80,4–91,5	23,2–54,0
<i>Micromonospora</i>	21,8–35,5	22,6–26,1	7,1–28,2	7,6–17,8	40,9–73,0
Олигоспоровые формы	1,4–8,0	2,3–8,7	0–1,0	0,4–0,9	1,6–3,5
<i>Streptosporangium</i>	1,4–2,6	1,1–1,5	0–1,0	0–0,9	0–3,5
<i>Streptoverticillium</i>	0–5,7	0–2,3	0,6–4,1	0–0,5	0–0,4

были более выраженными, чем в ризосфере растений-трансформантов (рисунок). Стрептомицетный комплекс исходного сорта Самсун включал в обычных условиях виды шести, а в условиях засоления почвы – семи секций и серий. На фоне засоления увеличилось долевое участие в комплексе видов серии *Albus Albus*, а виды серии *Helvolo-Flavus Helvolus* были отмечены как вновь появившиеся. Доминировали в ризосфере сорта

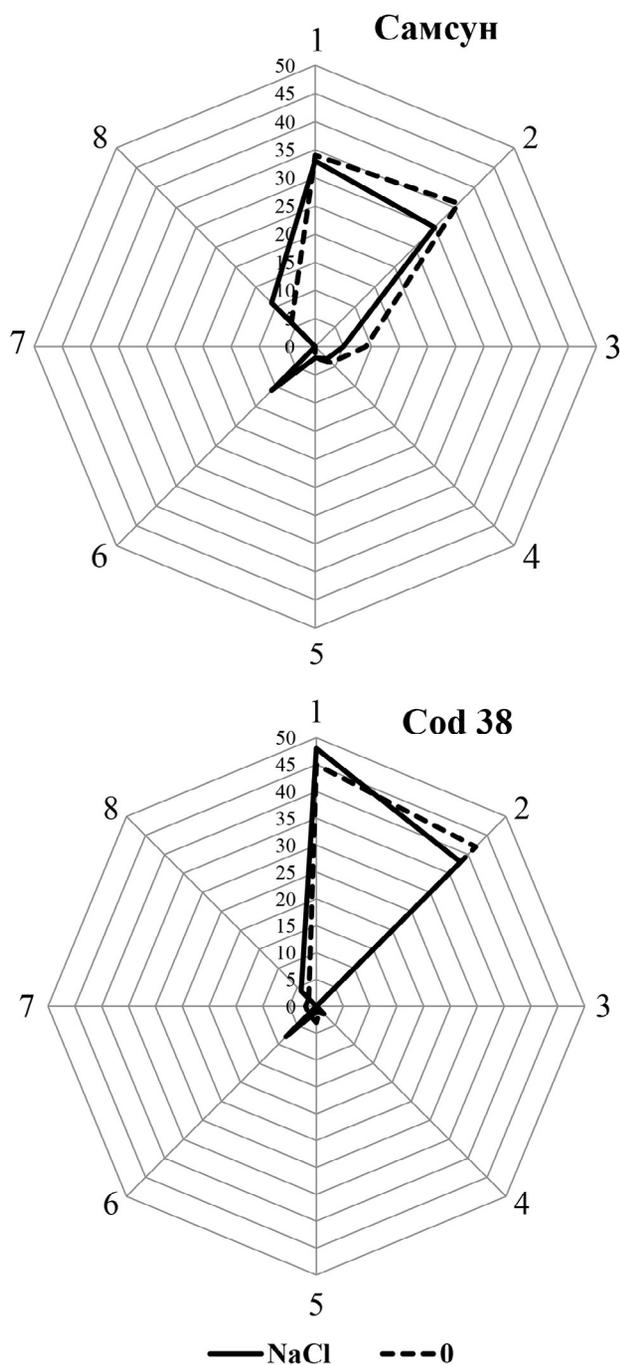


Рисунок. Долевое участие (%) в ризосферных комплексах табака стрептомицетов из секций и серий: 1 – *Cinereus Achromogenes*, 2 – *Cinereus Chromogenes*, 3 – *Cinereus Aureus*, 4 – *Cinereus Violaceus*, 5 – *Imperfectus*, 6 – *Helvolo-Flavus Helvolus*, 7 – *Azureus*, 8 – *Albus Albus*.

Самсун на том и другом почвенном фоне виды серий *Cinereus Achromogenes* (33–34%) и *Cinereus Chromogenes* (30–36%). В ризосфере трансгенной линии CodA 38 количество цветковых секций и серий, а также состав доминантов практически не изменились по сравнению с исходным сортом, но показатели частоты встречаемости и долевого участия видов-доминантов при этом возросли, что указывает на концентрацию доминирования видов определенных цветковых групп на корнях подвергнутых трансформации растений. Различия между исходным сортом и линией CodA 38 отмечены также в отношении долевого участия в комплексе видов минорных секций и серий *Azureus*, *Imperfectus* и *Cinereus Violaceus*. В ризосфере трансформантов при солевом стрессе, как и в ризосфере исходного сорта, увеличилось по сравнению с обычными почвенными условиями относительное обилие видов серий *Albus Albus* и *Helvolo-Flavus Helvolus*.

Перестройки таксономической структуры актинобиоты, выявленные в ризосфере трансформантов табака, сопоставимы по величине с диапазоном изменчивости, наблюдаемой в ризосфере других культур и сортов, созданных традиционными методами селекции [22]. Следовательно, нет оснований считать, что имеющиеся различия в таксономической структуре актинобиоты связаны с функциональной активностью бактериального гена, встроенного в геном растения.

Ризосферные комплексы табака Самсун и трансгенной линии CodA 38 сравнивали также по функциональной структуре мицелиальных прокариот. Одной из важнейших экологических функций актиномицетов является регуляция численности других групп микроорганизмов в почве и ризосфере растений. Ни один штамм среди почвенных изолятов не обладал антифунгальной активностью при тестировании *in vitro*. Рост фитопатогенных бактерий *Pseudomonas putida* и *Clavibacter michiganensis* ограничивали соответственно 6% и 12% культур, выделенных вне ризосферы (табл. 2). Среди изолятов с корней исходного сорта Самсун, выращенного в обычных условиях, антагонисты грибов *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. proliferatum*, *Bipolaris sorokiniana* и *Alternaria* sp. встречались с частотой от 5% до 20%, а антагонисты бактерий – с частотой от 5% до 50% в зависимости от тест-культуры.

В выборке стрептомицетов из ризосферы трансгенной линии CodA 38 не выявлено штаммов с антибактериальной активностью, а встречаемость культур с антифунгальным действием в отношении тест-культур *Alternaria* sp., *F. proliferatum* и *Bipolaris sorokiniana* была одинаковой и составила по 22% в каждом случае.

Культуры стрептомицетов, полученные из ризосферы табака в условиях засоленной почвы, тоже проявили антагонистическую активность, но

набор ингибируемых ими тест-культур грибов и бактерий количественно и качественно отличался от того, который был выявлен при тестировании стрептомицетных изолятов из почвы, не подвергнутой солевому стрессу. Так, в условиях засоления ризосферные изоляты исходного сорта утратили способность ингибировать рост гриба *F. proliferatum*, а также бактерий *Erwinia rhapontici* и *P. putida*. Снизилась частота встречаемости антагонистов *Alternaria* sp. (на 10%) и *C. michiganensis* (на 20%). Среди изолятов из ризосферы трансгенной линии CodA 38, наоборот, на фоне засоления увеличилась доля антагонистов грибов *F. proliferatum* (на 51%), *Alternaria* sp. (на 31%), *F. oxysporum* (на 13%) и фитопатогенной бактерии *C. michiganensis* (на 60%). Но при этом в три раза снизилась частота встречаемости антагонистов гриба *B. sorokiniana* (с 22% до 7%), тогда как в выборке изолятов с корней табака исходного сорта этот показатель, напротив, на фоне засоления увеличился с 10% до 30%.

Оценку достоверности различий в распространении стрептомицетов-антагонистов, наблюдаемых между выборками изолятов из ризосферы растений исходного сорта и трансгенной линии, проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Результаты обработки полученных данных с помощью рангового метода анализа показали, что найденное фактическое значение $U = 22$ больше критического значения $U_{кр} = 13$ для 5%-го уровня статистической значимости (объемы сравниваемых выборок n_1 и n_2 равны 8). Это позволяет заключить, что различия в рассматриваемых вы-

борках не являются статистически значимыми и носят случайный характер.

Наряду с антагонистическим действием в отношении фитопатогенов актиномицеты участвуют в конвейерной переработке поступающего в почву растительного опада. Важную роль в деструкции наиболее распространенного растительного полимера – клетчатки – играет синтез ферментов целлюлазного комплекса. При лабораторном тестировании ризосферных изолятов на среде с добавлением карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в качестве единственного источника углерода практически все культуры в той или иной степени проявили способность к утилизации этого полимера. Частота встречаемости стрептомицетов-целлюлозолитиков в ризосфере линии CodA 38 (92%–100%) незначительно отличалась от встречаемости в ризосфере растений исходного сорта (95%–100%) (табл. 3). Однако у трансформантов в обычных условиях доля изолятов с величиной зоны деструкции КМЦ, превышающей 30 мм, была почти вдвое меньше (42%), чем у исходного сорта (80%). В условиях солевого стресса различия между сравниваемыми генотипами растений по этому показателю, а также по средним значениям величины зоны деструкции КМЦ были незначительными, на что указывают расчетные значения примененного U-критерия ($U_{факт.} > U_{кр.}$ при $p = 0,95$).

Таким образом, встройка бактериального гена *codA* в геном табака для повышения его солеустойчивости не вызвала значимых изменений в численности и таксономической структуре ак-

Таблица 2

Распространение стрептомицетов-антагонистов в почве и ризосфере в зависимости от генотипа табака и почвенного фона

Почва	Фон	Частота встречаемости антагонистов фитопатогенов, %							
		<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium culmorum</i> P-3/16	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Alternaria</i> sp. Я19/3	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>
Вне ризосферы	0	0	0	0	0	0	0	6	12
Из ризосферы табака Самсун	0	20	15	5	20	10	5	5	50
	NaCl	20	15	0	10	30	0	0	30
Из ризосферы табака CodA 38	0	0	0	22	22	22	0	0	0
	NaCl	13	0	73	53	7	0	0	60

Таблица 3

Характеристика способности изолятов стрептомицетов к разложению целлюлозы в зависимости от генотипа табака и почвенного фона

Параметр	Ризосфера табака				Почва вне ризосферы
	Самсун		CodA 38		
	0	NaCl	0	NaCl	
Частота встречаемости целлюлозолитиков, %	95	100	92	100	94
Доля изолятов с зоной деструкции КМЦ ≥ 30 мм, %	80	45	42	53	38
Величина зоны деструкции КМЦ в среднем, мм	$30,7 \pm 8,1$	$28,7 \pm 7,0$	$25,8 \pm 10,8$	$29,9 \pm 4,8$	$22,9 \pm 10,0$

Примечание: КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

тинобиоты, ассоциированной с корнями растений-трансформантов, за исключением снижения родового разнообразия, измеренного с помощью индекса Шеннона, и концентрации доминирования в стрептомицетном комплексе видов серий *Cinereus Achromogenes* и *Cinereus Chromogenes*.

Трансформация табака по гену холиноксидазы не сопровождалась изменением функциональной структуры выделенного из ризосферы комплекса стрептомицетов. Различия в соотношении изолятов с антимикробной и целлюлозолитической активностью в ризосфере исходного сорта и трансгенной линии имели случайный характер, о чем свидетельствуют результаты обработки данных непараметрическим методом статистического анализа.

В литературе были описаны случаи, когда экспрессия в растениях гетерологичных генов влекла за собой перестройки ризосферных микробных сообществ, существенные для экологического состояния почвы. В частности, негативные тенденции были связаны с интродукцией в геном растений гена *4 epsps* – енолпирувилшикиматфосфат-синтетазы из *Agrobacterium* sp. CP4 – для придания устойчивости к гербициду раундап [23] и гена *cryIAb* – дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* – для защиты от насекомых-вредителей [24]. Авторы полагают, что установленное влияние растений-трансформантов на почвенное микробное сообщество обусловлено, прежде всего, корневой экскрецией в ризосферу новых трансгенных белков. Отсутствие видимых эффектов трансгена *codA*, в отличие от случаев, описанных в литературе, может быть объяснено локальным накоплением нового трансгенного продукта – ГБ – в надземной части растений. Встроенная в наш случай генетическая

конструкция была снабжена сигнальной последовательностью, отвечающей за доставку белкового продукта внутрь пластидного компартмента [25].

В генной инженерии растений, устойчивых к солевому и другим эдафическим стрессам, в настоящее время используется довольно значительное количество разнообразных генов, вовлекаемых в пути передачи сигнала, регуляции экспрессии, а также генов, кодирующих ферменты синтеза функциональных и структурных соединений с протекторным действием [5, 6]. Потенциал их воздействия на окружающую среду и, в первую очередь, на почву может варьировать в зависимости от конкретного вида и экологических условий выращивания растений, а также от техники трансформации и встраиваемой генетической конструкции. Поэтому исследования, направленные на выяснение того, существуют ли специфические ответы со стороны почвенных и ризосферных микроорганизмов на различные категории генетически модифицированных растений, разработанных на сегодняшний день, продолжают сохранять свою актуальность. Своевременная диагностика негативных тенденций позволит сохранить природный гомеостаз почвенного микробного сообщества, необходимый для оптимального круговорота питательных веществ, подавления фитопатогенов, стимуляции роста растений и поддержания в норме экологического состояния почвы и окружающей среды.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №19-016-00207_а). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Machado R.M.A., Serralheiro R.P. Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization // Horticulturae. 2017. Vol. 3. N 2: 30.
2. Pimentel D., Berger B., Filiberto D., Newton M., Wolfe B., Karabinakis E., Clark S., Poon E., Abbett E., Nandaopal S. Water resources: Agricultural and environmental issues // BioScience. 2004. Vol. 54. N 10. P. 909–918.
3. Singh A. Soil salinization management for sustainable development: A review // J. Environ. Manage. 2021. Vol. 277: 111383.
4. Butcher K., Wick A.F., DeSutter T., Chatterjee A., Harmon J. Soil salinity: a threat to global food security // J. Agron. 2016. Vol. 108. N 6. P. 2189–2200.
5. Kolodyazhnaya Y.S., Kutsokon N.K., Levenko B.A., Syutikova O.S., Rakhmetov D.B., Kochetov A.V. Transgenic plants tolerant to abiotic stresses // Cytol. Genet. 2009. Vol. 43. N 2. P. 132–149.
6. Reguera M., Peleg Z., Blumwald E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops // Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech. 2012. Vol. 1819. N 2. P. 186–194.
7. Negrão S., Schmöckel S.M., Tester M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress // Ann. Bot. 2017. Vol. 119. N 1. P. 1–11.
8. Liang C., Zhang X.Y., Luo Y., Wang G.P., Zou Q., Wang W. Overaccumulation of glycine betaine alleviates the negative effects of salt stress in wheat // Russ. J. Plant Physiol. 2009. Vol. 56. N 3. P. 370–376.
9. Goel D., Singh A.K., Yadav V., Babbar S.B., Murata N., Bansal K.C. Transformation of tomato with a bacterial *codA* gene enhances tolerance to salt and water stresses // Russ. J. Plant Physiol. 2011. Vol. 168. N 11. P. 1286–1294.
10. Tran N.H.T., Oguchi T., Matsunaga E., Kawaoka A., Watanabe K.N., Kikuchi A. Transcriptional enhancement of a bacterial choline oxidase A gene by an

HSP terminator improves the glycine betaine production and salinity stress tolerance of *Eucalyptus camaldulensis* trees // Plant Biotechnol. (Tokyo). 2018. Vol. 35. N 3. P. 215–224.

11. Ladics G.S., Bartholomaeus A., Bregitzer P., Doerr N.G., Gray A., Holzhauser T., Parrott W. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants // Transgenic Res. 2015. Vol. 24. N 4. P. 587–603.

12. Shrivastava P., Kumar R. Actinobacteria: Eco-friendly candidates for control of plant diseases in a sustainable manner // New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Actinobacteria: Diversity and biotechnological applications / Eds. B.P. Singh, V.K. Gupta, and A.K. Passari. Elsevier, 2018. P. 79–91.

13. Vurukonda S.S.K.P., Giovanardi D., Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. N 4: 952.

14. Hamed J., Mohammadipannah F. Biotechnological application and taxonomical distribution of plant growth promoting actinobacteria // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2015. Vol. 42. N 2. P. 157–171.

15. Murachige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.

16. Кауричев И.С., Ганжара Н.Ф., Гречин И.П. Практикум по почвоведению. М.: Колос, 1980. 298 с.

17. Qiao G., Lin S., Xie L., Zhuo R. Over-expression of the *codA* gene by Rd29A promoter improves salt tolerance in *Nicotiana tabacum* // Pak. J. Bot. 2013. Vol. 45. N 3. P. 821–827.

18. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А., Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.

19. Teather R.M., Wood P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen // Appl. Environ. Microbiol. 1982. Vol. 43. N 4. P. 777–780.

20. Labeled D.P., Dunlap C.A., Rong X., Huang Y., Doroghazi J.R., Ju K.S., Metcalf W.W. Phylogenetic relationships in the family Streptomycetaceae using multi-locus sequence analysis // Antonie Van Leeuwenhoek. 2017. Vol. 110. N 4. P. 563–583.

21. Subramaniam G., Thakur V., Saxena R.K., Vadlamudi S., Purohit S., Kumar V., Varshney R.K. Complete genome sequence of sixteen plant growth promoting *Streptomyces* strains // Sci. Rep. 2020. Vol. 10. N 1: 10294.

22. Shirokikh I.G., Zenova G.M., Merzaeva O.V., Lapygina E. V., Batalova G.A., Lysak L.V. Actinomycetes in the prokaryotic complex of the rhizosphere of oats in a soddy-podzolic soil // Eurasian Soil Sci. 2007. Vol. 40. N 2. P. 158–162.

23. Kremer R.J., Means N.E. Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms // Eur. J. Agron. 2009. Vol. 31. N 3. P. 153–161.

24. Conner A.J., Glare T.R., Nap J.P. The release of genetically modified crops into the environment: Part II. Overview of ecological risk assessment // Plant J. 2003. Vol. 33. N. 1. P. 19–46.

25. Гулевич А.А., Куренина Л.В., Баранова Е.Н. Использование системы таргетинга ферментов Fe-зависимой супероксиддисмутазы и холинксидазы в хлоропласт как стратегия эффективной защиты растений от абиотических стрессов // Росс. с.-х. наука. 2018. № 1. С. 7–12.

Поступила в редакцию 22.09.2021

После доработки 05.11.2021

Принята в печать 15.11.2021

RESEARCH ARTICLE

Actinobiota in the rhizosphere of transgenic tobacco plants with increased tolerance to salt stress

I.G. Shirokikh* , Ya.I. Nazarova 

Federal Agricultural Research Center of North-East named N.V. Rudnitsky,
Lenina ul. 166a, Kirov, 610007, Russia

*e-mail: irgenal@mail.ru

Assessment of the safety of genetically modified plants for the microbial community of the soil and the environment is important due to the increase in the diversity of genes involved in the creation of genotypes of crops resistant to edaphic stress. Genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with the ability to synthesis glycinebetaine in chloroplasts was established by introducing the *codA* gene for choline oxidase from soil bacteria *Arthrobacter globiformis*. Synthesis of glycinebetaine helps to stabilize cells under salt stress. Plants wild type (variety Samsun) and the CodA 38 transgenic line were grown in pot culture on a normal soil background and under conditions of salt stress caused by 150 mM NaCl. The abundance, diversity and structure of actinomycete complexes were compared at the generic and species

level (*Streptomyces*) using parametric and rank methods of statistical analysis. The obtained data indicate the absence of significant ($p = 0.95$) changes in the number and taxonomic structure of actinobiota, frequency of occurrence of streptomyces-antagonists of phytopathogenic fungi and bacteria, streptomyces-cellulolytics in the rhizosphere of transformant plants with genetically increased resistance to salt stress. It is concluded that it is necessary to continue research on the specific reactions of soil and rhizosphere microorganisms to various categories of genetically modified plants.

Keywords: *soil salinization, transgenic plants, choline oxidase gene, Streptomyces, antagonists, cellulolytics*

Funding: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project no. 19-016-00207_a.

Сведения об авторах

Широких Ирина Геннадьевна – докт. биол. наук, зав. лабораторией биотехнологии растений и микроорганизмов Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого. Тел.: 8-3332-33-10-39; e-mail: irgenal@mail.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-3319-2729>

Назарова Янина Иордановна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов Федерального аграрного научного центра Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого. Тел.: 8-3332-33-10-39. e-mail: yan1997183@yandex.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0002-2945-5282>

МНЕНИЕ

УДК 576.35:57.017.6

**Размышления геронтолога-пессимиста,
или почему мы все еще не живем 1000 лет****А.Н. Хохлов** 

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Излагается взгляд автора на современное состояние геронтологических исследований. Он полагает, что получивший в настоящее время широкое распространение отход от принципов классической геронтологии, сформулированных еще в XX в., отразился на работах в области биологии старения (как теоретических, так и экспериментальных) далеко не лучшим образом. Пренебрежение фундаментальными принципами геронтологических исследований привело к тому, что в большинстве работ классическое определение старения как совокупности возрастных изменений практически здоровых индивидов, приводящих к увеличению вероятности смерти, игнорируется. Акцент делается на оценке средней и максимальной продолжительности жизни изучаемых организмов, даже если они являются нестареющими. Продление времени жизни таких объектов не может считаться модификацией скорости их старения. Подчеркивается, что особое внимание сейчас уделяется молекулярным возрастным изменениям, которые некоторые геронтологи и считают старением, хотя это всего лишь его возможный механизм или следствие. Однако геронтологи очень часто изучают как раз, оценивая модификацию скорости таких возрастных изменений. В то же время, как справедливо считает классическая геронтология, принципов которой автор призывает придерживаться, без снятия кривых выживания контрольной и опытной когорты невозможно сделать корректный вывод о том, является ли изучаемое соединение геронпротектором. При этом очень важен подход к формированию таких когорт, включающий оценку минимального необходимого количества организмов в них, а также «качества» их здоровья. Рассматриваются две геронтологические статьи, опубликованные в самых высокорейтинговых научных журналах и потому привлечшие большое внимание соответствующих специалистов. Это выразилось, в том числе, и в высокой цитируемости данных работ, хотя выполнены они были со значительными нарушениями принципов классической геронтологии, которые впоследствии были выявлены другими исследователями. Подчеркивается также, что в настоящее время рейтинг научного журнала для многих читателей-геронтологов стал гораздо более важным, чем корректность излагаемых в статье результатов и идей. Приводится список методологических проблем, которые, по мнению автора, не только осложняют ситуацию с современными геронтологическими исследованиями, но и делают практически недостижимыми ощутимые успехи в данной области.

Ключевые слова: *геронтология, старение, продолжительность жизни, экспериментально-геронтологические исследования, научные публикации, нестареющие виды, зародышевая линия, клеточное старение*

Некоторое время назад со мной связались представители популярного канала «ПостНаука» портала «YouTube» и предложили поучаствовать в программе о старении и продлении жизни. При этом они прислали мне целый список вопросов, которые предполагается обсудить. Не могу сказать, чтобы меня эти вопросы удивили — их специалистам-геронтологам всегда задают на мероприятиях такого рода. Я еще раз убедился в этом, просмотрев несколько уже снятых интервью на указанную тему с различными биологами и медиками, причем не только на канале «ПостНаука», но и на других

каналах, занимающихся популяризацией науки (надо сказать, что их популярность в сети неуклонно растет, о чем свидетельствует огромное количество подписчиков, а некоторые ролики по количеству просмотров реально обходят даже ролики известных эстрадных исполнителей). Ответы были также стандартными, но мне стало понятно, что уровень знаний в своих областях дававших интервью ученых гораздо выше моего собственного. Они были прекрасно осведомлены о тонких возрастных изменениях, сопровождающих процесс старения, и очень много знали о современных мо-

лекулярно-генетических подходах к модификации нашего организма, которая, как предполагается, должна существенно замедлить старение и привести к реальному увеличению продолжительности жизни человека. Однако было одно маленькое «но»: в большинстве случаев игнорировались основные понятия геронтологии, на которых, собственно, и строится вся эта наука. В частности, практически никто из коллег не давал определения того, что же это такое – старение. Подразумевалось, что это и так абсолютно очевидно, хотя я никак не могу согласиться с таким подходом.

Некоторое время назад мы вместе с моими китайскими коллегами из Харбинского политехнического университета (Harbin Institute of Technology) опубликовали пару статей [1, 2], в которых изложили свою точку зрения на преподавание геронтологии и биологии старения студентам соответствующих направлений. При этом мы основывались на моем опыте чтения курса лекций «Основы биологии старения» на биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и в Центре инженерно-медицинских и биологических наук Харбинского политехнического университета (Китай). В этих статьях была подчеркнута важность системного подхода к изучению геронтологии, делающего совершенно необходимым чтение вводного курса лекций по основам биологии старения. Предполагалось, что адекватное восприятие студентами обоих вузов результатов современных молекулярно-геронтологических исследований невозможно без понимания основных фундаментальных определений и понятий, используемых как в теоретической, так и в экспериментальной геронтологии. По-видимому, нельзя изучать тонкие механизмы старения и долголетия на клеточном и молекулярном уровне, не имея представления о том, что такое старение, биологический возраст, ожидаемая продолжительность жизни, клеточное старение, поперечные и лонгитудинальные исследования, а также о том, как нужно правильно снимать кривые выживания экспериментальных животных и формировать контрольную когорту [3].

В последующие годы я неоднократно возвращался к обсуждению методологических проблем, встающих перед современной геронтологией, в многочисленных публикациях. Значительная их часть [4–11] была напечатана в журнале «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» / “Moscow University Biological Sciences Bulletin” [12]. Кроме того, эти вопросы были затронуты в целом ряде больших обзоров, опубликованных в других изданиях [13–19]. Боюсь однако, что практически ни на кого изложенные в этих статьях соображения не произвели никакого впечатления.

Как ни странно, в большом количестве современных геронтологических работ игнорируется

классическое определение старения как совокупности возрастных изменений организма, ведущих к снижению его жизнеспособности и увеличению вероятности смерти. В связи с этим периодически озвучивается идея (например, В.Н. Гладышевым [20]), согласно которой старение человека начинается сразу после его рождения (и даже раньше!). И это при том, что увеличение вероятности смерти начинается только после 14–15 лет. А те изменения (и очень серьезные!), которые происходят до этого, связаны лишь с процессами развития, но никакого отношения к старению не имеют. Впрочем, многие исследователи называют старением как раз накопление каких-либо изменений (ДНК, белков, коллагена, мембран, каскадов и пр.) в организме, не связывая эти процессы с вероятностью смерти. Таким образом, складывается впечатление, что нестареющим видам (у которых вероятность умереть постоянна) старение также свойственно, ибо у них в организме непрерывно что-то меняется. По-видимому, сходная ситуация имеет место при развитии организма до наступления зрелости. У ребенка со временем происходит огромное количество различных изменений, но мы не связываем их со старением, т.к. они никак не влияют на вероятность смерти (по крайней мере, точно не увеличивают ее). Например, активность иммунной системы сильно увеличивается от рождения до 14–15-летнего возраста, и это как раз увеличивает жизнеспособность организма.

Конечно, поддерживаемое мной определение старения тоже не идеально. В частности, можно себе представить ситуацию, когда длительная хроническая болезнь изменяет организм со временем и тем самым увеличивает вероятность его смерти. Поэтому в «правильных» геронтологических работах применительно к испытуемым часто используется выражение «практически здоровые люди» (т.е. те, у кого не удалось обнаружить никаких очевидных болезней и расстройств). Именно из таких людей или животных и нужно формировать контрольные когорты при изучении потенциальных геропротекторов [3]. Надо сказать, что вопросы правильной постановки геронтологических экспериментов были подробно рассмотрены еще в 1975 г. Т.Л. Дубиной в ее блестящей монографии «Введение в экспериментальную геронтологию» [21]. Я ее всегда рекомендую прочесть всем интересующимся биологией старения, но большинство, тем не менее, предпочитает читать современные научные статьи, содержащие результаты, полученные «крутыми» молекулярными методами, и опубликованные в высокорейтинговых журналах, даже если методологически эксперименты были поставлены неверно.

В своих докладах на научных конференциях я часто рассказываю историю о двух очень известных геронтологических работах, опубликованных в “Nature” и “Science”. В первой [22] описывались

эксперименты, из которых следовало, что мутантные мыши $p66^{shc-/-}$ живут на 30% дольше, чем животные дикого типа. На этот факт как на установленный ссылалось очень большое количество ученых-геронтологов. К сожалению, ни в разделе «Материалы и методы», ни в «Дополнительных материалах» мне не удалось найти четкого указания, на каком количестве мышей были получены соответствующие кривые выживания. Конечно, если судить по «ступенькам» на кривых Каплана–Майера, можно предположить, что животных в каждой группе было около 10, хотя однозначно сделать такой вывод все равно нельзя. Однако даже если это так, то заключение авторов о положительном влиянии мутации на старение мышей тем более кажется сомнительным, ибо, как неоднократно отмечалось в соответствующих руководствах (см., например, [21]), в экспериментально-геронтологических исследованиях и контрольная, и опытная когорты должны состоять не менее чем из 50 животных. В противном случае «хвосты» кривых выживания строятся на слишком маленьком количестве объектов, и полученная разница не может быть корректно проанализирована статистически. Кроме того, хотелось бы заметить, что различия в некоторых экспериментах авторы данной статьи назвали «не полностью достоверными» (например, в одном из случаев указано $p = 0,057$). Мне это кажется по меньшей мере странным для такого солидного журнала.

Вторая из упомянутых работ [23] была посвящена изучению влияния известного противоракового препарата бексаротена на мышей с модельной болезнью Альцгеймера. Авторы обнаружили, что под влиянием данного препарата количество бета-амилоида в мозгу мышей уменьшается и это сопровождается улучшением памяти и когнитивных способностей животных. В результате был сделан вывод, что бексаротен должен быть очень эффективен в лечении болезни Альцгеймера у людей. Лично у меня использованная модельная система вызвала определенные сомнения (к сожалению, очень часто перенесение на людей данных, полученных в экспериментально-геронтологических исследованиях на животных, является довольно проблематичным), и я написал коллегам, попытавшись узнать, что они думают о клинических испытаниях препарата. Мне сообщили, что такие испытания уже начинаются, ибо препарат давно утвержден Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (Food and Drug Administration, FDA) и с изучением его действия на болезнь Альцгеймера в клинике не будет этических проблем, а в его эффективности авторы не сомневаются. К сожалению, из этого ничего не получилось. В последующие годы появилось большое количество публикаций (см., например, [24]), опровергнувших идею авторов о возможности лечения бексаротеном болезни Альцгеймера

у людей. Так печально закончилась история, которую я назвал «сагой о бексаротене и болезни Альцгеймера».

Очень важно подчеркнуть, что в обоих рассмотренных случаях работы были опубликованы в чрезвычайно престижных научных журналах. Как я уже неоднократно отмечал в своих «научометрических» статьях [25–27], среди ученых, работающих в самых различных областях науки, сложилось мнение, согласно которому самое важное – это не ЧТО публикуют их коллеги, а ГДЕ они это публикуют. Такая ситуация приводит к тому, что результаты и выводы откровенно некорректных (статистически, методически, методологически и т. п.) работ, напечатанных в «крутых» журналах с очень высокими импакт-факторами, автоматически принимаются на веру большинством читателей. К сожалению, геронтология и биология старения – не исключение из этого правила. Мне кажется, что еще более сложной нашу борьбу со старением делает ситуация с грантами по этим дисциплинам, которые, как правило, выделяются не за идеи, а за уже имеющийся серьезный багаж публикаций в высокорейтинговых журналах.

На мой взгляд, автор любой концепции старения, на которой он основывается, проводя свои исследования, должен попытаться ответить на следующие вопросы:

1) Насколько универсален процесс старения? Иначе говоря, одинаковы ли механизмы старения разных видов? И как стареют растения, бактерии, грибы, простейшие, микоплазмы и т.д. (если вообще можно сказать, что они стареют)?

2) Как объяснить то, что наряду со стареющими организмами (вероятность смерти которых увеличивается с возрастом) существуют и нестареющие (некоторые кишечнополостные, рыбы и др.)? По крайней мере, хотелось бы, чтобы концепция рассказывала о том, как реализуется стратегия «пренебрежимого старения» (“negligible aging”) [28].

3) Почему у разных видов разная продолжительность жизни?

4) Как различаются определяющие старение организма процессы в делящихся и неделящихся (таких, например, как нейроны) клетках? Можно было бы спросить, как стареют те и другие, но для этого сначала надо было бы точно определить, что это такое – старение клеток [4].

5) Каким образом можно представить эволюцию процесса старения в рамках формулируемой концепции (вспомним представления «раннего» и «позднего» Вейсмана) [29]?

6) Каким образом «ускользает» от старения зародышевая линия, т.е. совокупность половых клеток, обеспечивающая передачу генетической информации в практически бесконечном ряду поколений?

И, между прочим, я полагаю, что сторонники запрограммированного старения (именно старения, а не смерти!) не смогут ответить на все эти вопросы [14, 16].

Хотелось бы также заметить, что интерес к самому последнему вопросу в этом списке вновь и вновь возникает на протяжении многих лет [10, 30]. Однако прошедший 15 октября 2021 г. вебинар Секции геронтологии Московского общества испытателей природы при МГУ, специально посвященный данной проблеме, со всей очевидностью продемонстрировал, что большинство наших геронтологов путает действительно существующее бессмертие зародышевой линии и несуществующее бессмертие составляющих ее половых клеток. Как было уже неоднократно продемонстрировано в многочисленных работах, и яйцеклетки, и сперматозоиды подвержены возрастным изменениям, которые отрицательно сказываются на их жизнеспособности и фертильности. Иначе говоря, они стареют — как и соматические клетки организма. И только наличие соответствующих «барьеров» [10, 30] позволяет всей популяции половых клеток, образующей зародышевую линию, существовать практически бесконечно.

Итак, значительно возросший в последнее время интерес к экспериментально-геронтологическим исследованиям привел к парадоксальной ситуации: хотя в этой области появляется все большее и большее количество работ, к сожалению, лишь небольшая их часть действительно посвящена изучению механизмов старения. На мой взгляд, это определяется, в числе прочего, следующими обстоятельствами:

1) Как правило, классическое определение старения как совокупности возрастных изменений практически здоровых организмов, приводящих к увеличению вероятности смерти, игнорируется.

2) Основной акцент делается на увеличении или уменьшении продолжительности жизни, хотя очень часто, как уже отмечалось выше, это не имеет никакого отношения к модификации процесса старения (в частности, вполне успешно можно продлить жизнь нестареющим организмам; в то же время, само наличие старения не обязательно свидетельствует о низком долголетии) [13]. Надо сказать, что термин «средняя продолжительность жизни» человека в большинстве случаев многими воспринимается неверно. Имеет место некорректный перевод англоязычного термина *Life Expectancy*, и в русскоязычном варианте обязательно добавлять слово «ожидаемая». Это некая виртуальная характеристика, основанная на построении условной кривой выживания когорты людей, родившихся в конкретном году, с помощью показателей смертности для каждого возраста, выявленных в этом самом году. Иначе говоря, если эти показатели не изменятся в ближайшие 100–120 лет, то средняя продолжительность жизни

членов данной когорты будет как раз такой же, как рассчитанная нами «средняя ожидаемая продолжительность жизни». Этот принцип используется и при расчете данного показателя для любой когорты людей в любом возрасте.

3) В качестве как контрольных, так и опытных используются животные с определенными аномалиями (типа генетических заболеваний), так что любое благоприятное воздействие на соответствующие патологические процессы ведет к увеличению продолжительности жизни [3].

4) Слишком большое значение придается увеличению или уменьшению СРЕДНЕЙ продолжительности жизни, которая во многом определяется факторами, никак не связанными со старением. В частности, насколько мне известно, самое большое увеличение средней продолжительности человека было связано с открытием антибиотиков. Боюсь, что успешное лечение инфекционных болезней нельзя считать замедлением старения. Как я уже неоднократно писал в своих работах, при таком подходе даже обычная вода может считаться прекрасным геропротектором, ибо средняя продолжительность контрольных животных, которым вообще не дают питья, будет во много раз меньше, чем продолжительность жизни тех животных, которые получают воду в необходимом им количестве.

5) Все большее число геронтологических экспериментов проводится на модельных системах, обеспечивающих лишь косвенную информацию о механизмах старения, интерпретация которой во многом зависит от той фундаментальной концепции, которой придерживаются конкретные исследователи. В частности, это касается сложившейся в настоящее время ситуации с использованием термина «клеточное старение» (*cell senescence*). Если изначально он был введен для обозначения различных неблагоприятных изменений в нормальных клетках ВСЛЕДСТВИЕ исчерпания ими митотического потенциала, то теперь все чаще этим термином, наоборот, называют сопровождающееся определенным каскадом внутриклеточных реакций подавление пролиферации клеток (в том числе, и раковых) под влиянием различных ДНК-повреждающих факторов (см. обзор [4]).

6) И, наконец, то, что можно назвать «проблемой редукционизма». Подавляющее большинство геронтологических теорий, появившихся в последние десятилетия, сводили механизмы как «нормального», так и ускоренного или замедленного старения многоклеточных организмов к определенным макромолекулярным изменениям (не принципиально, стохастическим или запрограммированным) в составляющих их клетках. Это привело к появлению большого количества цитогеронтологических модельных систем, обеспечивающих изучение «возрастных» изменений

в клетках, освобожденных от «организменного шума», связанного с функционированием эндокринной и нервной систем. Такой редуционизм в экспериментально-геронтологических исследованиях («все определяется неблагоприятными изменениями отдельных клеток») способствовал, в частности, и разработке модели Хейфлика, а также некоторых моделей, используемых в нашей лаборатории (модель «стационарного старения», клеточно-кинетическая модель для тестирования геропротекторов и геропромоторов, оценка способности клеток к колониеобразованию и др.). В то же время, как свидетельствуют данные большого количества работ, появившихся в последнее время, фундаментальные механизмы старения реализуются, судя по всему, «системно». Иначе говоря, сведя геронтологические исследования к молекулярно-биологическим работам на изолированных клетках, мы потеряли большое количество информации о системных механизмах старения, которые, как мне кажется, и представляют основной интерес для современной биологии старения.

Нужно заметить, что я не одинок в своих представлениях о том, чем и как должны заниматься ученые-геронтологи. Чтобы это понять, достаточно почитать классические монографии по

биологии старения, написанные самыми авторитетными специалистами в данной области. В их числе (перечисляю в хронологическом порядке) – Бернард Стрелер [31], Александр Комфорт [32], Марион Лэмб [33], Майкл Роуз [34], Калед Финч [28], Леонард Хейфлик [35], Робин Холидей [36] и многие другие.

В заключение хотелось бы вернуться к упомянутому в начале статьи интервью для канала «ПостНаука». Оно вполне успешно прошло 28 сентября 2021 г. и практически полностью подтвердило мои соображения, изложенные выше. Комментарии и вопросы слушателей продемонстрировали, что большинство из них скептически относятся к «графикам выживания» и хотят слышать о молекулярных «супермеханизмах» старения, возможностях модного сейчас редактирования генома и «таблетках от старости». Так что, полагаю, без введения курсов основ биологии старения для биологов, медиков, да и для всех желающих нам точно не обойтись. В противном случае мы точно не будем жить 1000 лет.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, часть 2 (фундаментальные научные исследования, № 121032300215-6). Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J.* Teaching cytogerontology in Russia and China // *Adv. Gerontol.* 2012. Vol. 25. N 3. P. 513–516.
2. *Wei L., Li Y., He J., Khokhlov A.N.* Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2012. Vol. 67. N 1. P. 13–16.
3. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* On choosing control objects in experimental gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
4. *Khokhlov A.N.* Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytogerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013. Vol. 68. N 4. P. 158–161.
5. *Khokhlov A.N.* On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
6. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
7. *Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 4. P. 207–211.
8. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* Does aging have a purpose? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 4. P. 222–224.
9. *Khokhlov A.N.* Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: thirty years after // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
10. *Khokhlov A.N.* The immortality of the germ line: the neverending story // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 189–193.
11. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A.* Demographic approaches to the study of aging on cell cultures // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 262–267.
12. *Kirpichnikov M.P., Morgunova G.V., Khokhlov A.N.* Our journal—2020: what and how we publish // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 1. P. 1–6.
13. *Khokhlov A.N.* From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // *Biophysics.* 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
14. *Khokhlov A.N.* Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
15. *Khokhlov A.N.* Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastics? // *Biogerontology.* 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
16. *Khokhlov A.N.* Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // *Curr. Aging Sci.* 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
17. *Khokhlov A.N.* What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
18. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V.* Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical*

practice / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.

19. *Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* Anti-aging drug discovery in experimental gerontological studies: from organism to cell and back // *Aging: Exploring a Complex Phenomenon* / Ed. Sh.I. Ahmad. Taylor & Francis, 2018. P. 577–595.

20. Gladyshev V.N. The ground zero of organismal life and aging // *Trends. Mol. Med.* 2021. Vol. 27. N 1. P. 11–19.

21. Дубина Т.Л., Разумович А.Н. Введение в экспериментальную геронтологию. Минск: Наука и техника, 1975. 167 с.

22. *Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfranccone L., Pelicci P.G.* The p66^{shc} adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals // *Nature.* 1999. Vol. 402. N 6759. P. 309–313.

23. *Cramer P.E., Cirrito J.R., Wesson D.W., Lee C.D., Karlo J.C., Zinn A.E., Casali B.T., Restivo J.L., Goebel W.D., James M.J., Brunden K.R.* ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models // *Science.* 2012. Vol. 335. N 6075. P. 1503–1506.

24. *O'Hare E., Jeggo R., Kim E.M., Barbour B., Walczak J.S., Palmer P., Lyons T., Page D., Hanna D., Meara J.R., Spanswick D.* Lack of support for bexarotene as a treatment for Alzheimer's disease // *Neuropharmacology.* 2016. Vol. 100. P. 124–130.

25. *Khokhlov A.N.* How scientometrics became the most important science for researchers of all specialties // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 159–163.

26. Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. Научные публикации – хорошие, плохие, за пригоршню долларов // *Научный редактор и издатель.* 2021. Т. 6. № 1. С. 59–67.

27. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V.* Is it worth teaching biology students the basics of scientometrics and the instructions for the design of scientific articles, and if so, why? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021. Vol. 76. N 3. P. 77–82.

28. *Finch C.E.* Senescence, longevity, and the genome. Chicago-London: The University of Chicago Press, 1990. 938 pp.

29. *Kirkwood T.B.L., Cremer T.* Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress // *Hum. Genet.* 1982. Vol. 60. N 2. P. 101–121.

30. *Medvedev Zh.A.* On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanisms. A review // *Mech. Ageing Dev.* 1981. Vol. 17. N 4. P. 331–359.

31. *Strehler B.L.* Time, cells and aging. N.Y.-London: Academic Press, 1962. 270 pp.

32. *Comfort A.* Ageing: the biology of senescence. N.Y.-Chicago-San Francisco: Holt, Rinehart and Winston, Inc., 1964. 365 pp.

33. *Lamb M.J.* Biology of ageing. Glasgow-London: Blackie, 1977. 184 pp.

34. *Rose M.* Evolutionary biology of aging. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1991. 221 pp.

35. *Hayflick L.* How and why we age. NY: Ballantine Books, 1994. 400 pp.

36. *Holliday R.* Aging: the paradox of life: why we age. Springer Science & Business Media, 2007. 148 pp.

Поступила в редакцию 07.10.2021

После доработки 09.11.2021

Принята в печать 12.11.2021

OPINION

Reflections of a pessimistic gerontologist or why we still do not live 1000 years

A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

The author's view on the current state of gerontological research is presented. He believes that the widespread departure from the principles of classical gerontology, formulated back in the 20th century, has not been reflected in the works in the field of biology of aging (both theoretical and experimental) in the best way. The neglect of the fundamental principles of gerontological research has led to the fact that in most works the classical definition of aging as a set of age-related changes in practically healthy individuals, leading to an increase in the rate of mortality, is ignored. The emphasis is on assessing the average and maximum lifespan of the studied organisms, even if they are ageless. Extending the lifetime of such objects cannot be considered a modification of the rate of their aging. It is emphasized that special attention is now being paid to molecular age-related changes, which some gerontologists consider aging, although this is just its possible mechanism or consequence. However, geroprotectors are very often studied just by assessing the modification of the rate of such age-related changes. At the

same time, as classical gerontology rightly believes, the principles of which the author urges to adhere to, without taking the survival curves of the control and experimental cohort, it is impossible to draw a correct conclusion about whether the studied compound is a geroprotector. And an approach to the formation of such cohorts is very important, including an assessment of the minimum required number of organisms in them, as well as the “quality” of their health. A couple of gerontological articles published in the most highly ranked scientific journals and therefore attracted a lot of attention of relevant specialists are considered. This attention was expressed, among other things, in the high citation rate of these works, although they were performed with significant violations of the principles of classical gerontology, which were subsequently identified by other researchers. It is also emphasized that at present the rating of a scientific journal for many gerontological readers has become much more important than the correctness of the results and ideas presented in the article. A list of methodological problems is given, which, according to the author, not only complicate the situation with modern gerontological research, but also make tangible progress in this area practically unattainable.

Keywords: *gerontology, aging, life span, experimental gerontological studies, scientific publications, immortal species, germ line, cell aging*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032300215-6.

Сведения об авторе

Хохлов Александр Николаевич – докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru; ORCID <http://orcid.org/0000-0001-7454-7023>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК: 57.03+579.6+57.033+57.036+57.042

Влияние низкотемпературной плазмы атмосферного давления на культуру клеток *Paramecium caudatum***Г.А. Груздев^{1,*} , О.В. Карпухина^{2,3}, В.Г. Якунин⁴, А.Н. Иноземцев², В.П. Савинов⁴, В.Ю. Тимошенко^{5,6,7}, А.А. Каменский¹**

¹Кафедра физиологии человека и животных и ²кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, корп. 1;

⁴Кафедра физики полупроводников и криоэлектроники и ⁵кафедра физики низких температур и сверхпроводимости, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2;

⁶Физический институт имени П.Н. Лебедева, Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 53;

⁷Национальный исследовательский ядерный университет, Московский инженерно-физический институт, Россия, 115409, г. Москва, Каширское шоссе, д. 31

*e-mail: gleb-neuro.phys@mail.ru

Исследовано воздействие низкотемпературной плазмы, генерируемой плазмотроном в инертном газе (аргон, гелий) и в смеси инертного газа и воздуха, на культуру клеток *Paramecium caudatum*. Обнаружено влияние состава плазмы на уровень кислотности водной среды и характер гибели клеток. Полученные результаты обсуждаются с учетом образуемых под действием плазменной струи активных радикалов, а также отложенной реакции клеток на плазменное воздействие.

Ключевые слова: инфузории, *Paramecium caudatum*, свободные радикалы, низкотемпературная плазма, плазмотрон, цитотоксический эффект

Известно, что воздействие низкотемпературной плазмы, получаемой при помощи относительно компактных источников высокочастотного или дугового разрядов – плазмотронов [1, 2], способно активировать окислительный стресс у клеток и одноклеточных организмов, который приводит к их гибели [3–5]. Такой способ воздействия можно использовать для селективного уничтожения больных или поврежденных клеток, которые более чувствительны к окислительному стрессу или термическому воздействию, поскольку имеют нарушения в механизмах адаптации [6–7].

Поскольку низкотемпературная плазма может быть образована различными газами [2], это приводит к большому разнообразию ее свойств [3], что, очевидно, может изменить характер воздействия на биосистемы. Для использования низкотемпературной плазмы в биомедицинских целях важно знать влияние ее состава на вызываемые эффекты в модельных биосистемах.

Удобным модельным объектом в изучении окислительного стресса является одноклеточный эукариотический организм *Paramecium caudatum*. Данный объект позволяет исследовать влияние вызванного плазменным воздействием окисли-

тельного стресса на различных уровнях биологической организации. При культивировании клеток *P. caudatum* за короткое время можно получить большое количество одинаковых клонов, которые будут находиться в равных условиях, что, несомненно, является преимуществом при статистической обработке [6, 7]. Целью настоящей работы стало исследование воздействия низкотемпературной плазмы, генерируемой плазмотроном в инертном газе (аргон, гелий) и в смеси инертного газа и воздуха, на культуру клеток *P. caudatum*.

Материалы и методы

Работа была выполнена на чистой колонии клеток *P. caudatum*, которые содержали в условиях приближенных к естественной среде обитания при температуре 24 °С при pH = 7 с соблюдением 12-часового светового дня и ежедневным кормлением. Для профилактики чистоты колонии и контроля численности особей (защита от перенаселения и последующего самоуничтожения) проводилась ежемесячная фильтрация колонии через мелкодисперсную губку. За сутки до эксперимента и до конца регистрации численности кормление инфузорий приостанавливалось.

Плазмотрон представлял собой высоко-рекурсивный источник дугового разряда, который давал возможность создавать поток низкотемпературной плазмы как в чистом инертном газе (аргон, гелий), так и в их смеси с воздухом [2, 3]. Мы использовали аргон (чистота 99,9996) и гелий (чистота 99,9996). Поток воздуха получался при помощи безмасляного компрессора Metabo Power 180-5W (Metabo, Германия). Плазменная дуга формировалась в потоке газа с расходом 2 л/мин, к которому на выходе в перпендикулярном направлении подводился дополнительный поток с расходом газа 10 л/мин (см. детали в ранее опубликованной работе [2]). В нашем случае низкотемпературной плазмы в газовой смеси поток воздуха использовался также для охлаждения элементов плазмотрона.

Схема эксперимента. При проведении эксперимента клетки *P. caudatum* из маточной культуры были разделены на три группы объемом по 6 мл с плотностью около 600 клеток/мл, которые помещались в стеклянные сосуды для последующей обработки низкотемпературной плазмой. Высота слоя жидкости в сосудах с клетками составляла 5 мм. Сосуды с клетками располагались на расстоянии 20 см от выходного отверстия плазмотрона, что позволяло избежать перегрева исследуемых образцов. Прямые измерения показали, что рост температуры водной среды не превышал 2–3 °С в течение 5 мин плазменного воздействия.

На первую группу клеток воздействовали низкотемпературной плазмой в течение 1 мин, на вторую группу – в течение 3 мин и на третью группу – в течение 5 мин. Также на протяжении всего эксперимента измеряли рН среды. Подсчет клеток производился за сутки до воздействия, через 4, 24, 48 и 72 ч после воздействия плазмы. Подсчет клеток для каждой группы проводился по видеозаписям их траекторий движения, которые обрабатывались в программе ImageJ (Fiji, США) с использованием плагина “counting cell” [8].

Статистическая обработка. Статистический анализ проводился в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с помощью непараметрического

критерия Манна–Уитни после проверки на нормальность критерием Шапиро–Вилко для больших выборок с $p < 0,05$. При графическом представлении полученных данных использовались значения интерквартильных размахов.

Результаты и их обсуждение

При изучении влияния воздействия низкотемпературной плазмы на уровень кислотности воды было установлено, что величина рН смещается к меньшим значениям (рис. 1А). При этом степень изменения зависела от состава плазмы и от времени воздействия. Так, в случае плазмы инертных газов наблюдается слабое снижение рН, которое более заметно для аргоновой плазмы. Данный эффект можно объяснить более эффективным возбуждением радикалов и метастабильных состояний молекул воздуха при взаимодействии с атомами аргона в метастабильных состояниях [5]. При использовании плазмы, в состав которой входил воздух, наблюдалось более резкое снижение уровня рН воды. Это можно объяснить более высокой концентрацией образующихся радикалов и возбужденных состояний кислорода, азота и оксидов азота, что вызывает формирование молекул пероксида в воде [9, 10].

Однако при воздействии низкотемпературной плазмы на водную суспензию маточной культуры *P. caudatum* изменения кислотности после воздействия не имели значимых отличий от значений кислотности необлученного маточного раствора с клетками (рис. 1Б). Это можно объяснить тем, что в процессе жизнедеятельности инфузории способны формировать буферную равновесную систему, которая предохраняет их от внешних воздействий [11]. При этом клетки могут поглощать активные формы кислорода, что, очевидно, приводит к их окислительному стрессу.

Далее в работе было рассмотрено воздействие низкотемпературной плазмы состава аргон-воздух и гелий-гелий на число клеток *P. caudatum* через 4, 24, 48 и 72 ч после плазменной обработки. На рис. 2 представлены зависимости относительного числа клеток от времени наблюдения после обра-

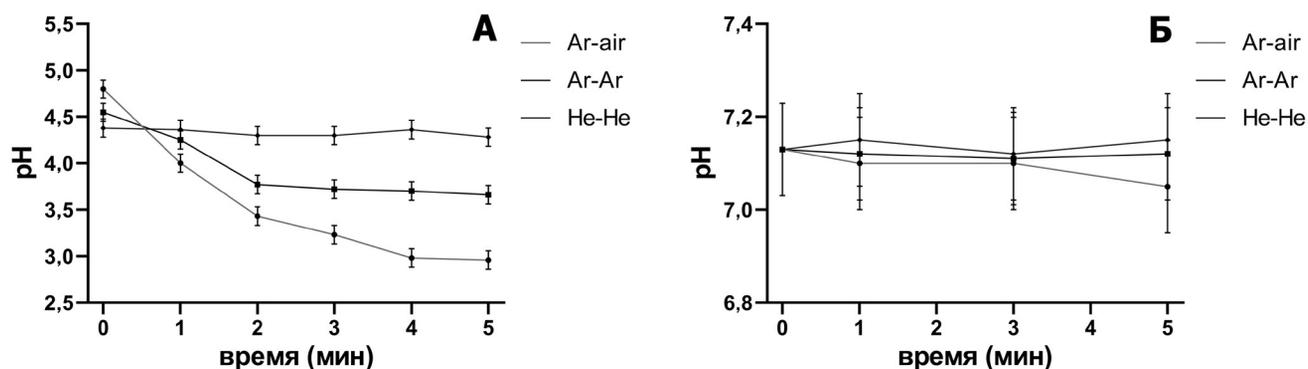


Рис. 1. Зависимости уровня рН от времени воздействия плазмы различного состава для (А) деионизованной воды, (Б) маточной культуры *Paramecium caudatum*.

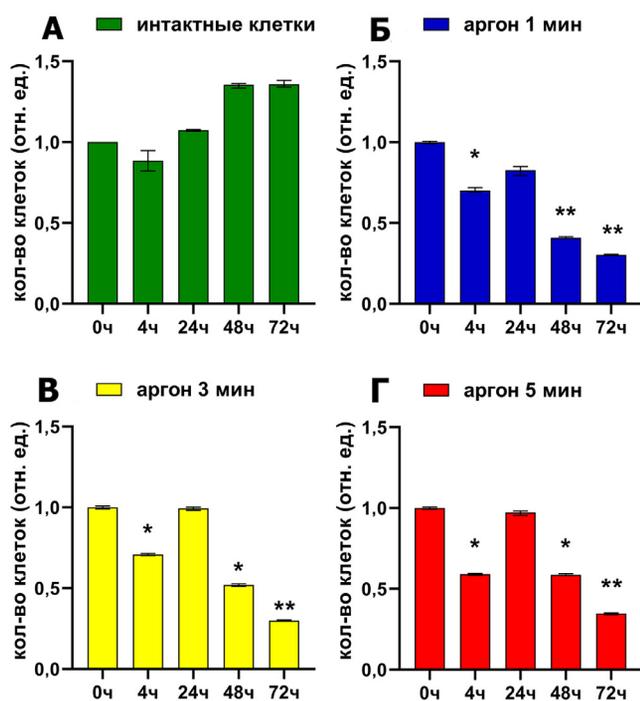


Рис. 2. Зависимость гибели клеток *Paramecium caudatum* в течение последующих 74 ч после обработки низкотемпературной аргоновой плазмой для следующих групп: А – контроль; Б – воздействие плазмой в течение 1 мин; В – воздействие плазмой в течение 3 мин; Г – воздействие плазмой в течение 5 мин. Звездочками (*) обозначены статистически значимые изменения по сравнению с исходным количеством клеток для каждой из групп, $p < 0,05$.

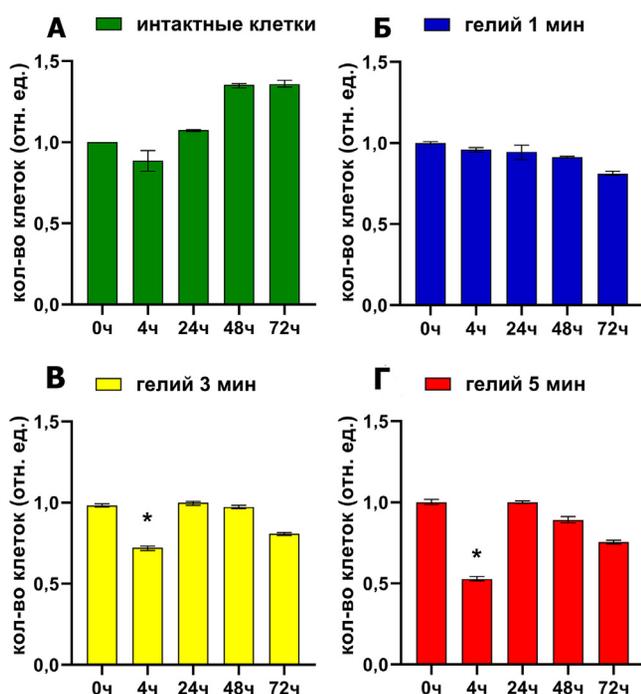


Рис. 3. Зависимость гибели клеток *Paramecium caudatum* в течение последующих 74 ч после обработки низкотемпературной гелиевой плазмой для следующих групп: А – контроль; Б – воздействие плазмой в течение 1 мин; В – воздействие плазмой в течение 3 мин; Г – воздействие плазмой в течение 5 мин. Звездочками (*) обозначены статистически значимые изменения по сравнению с исходным количеством клеток для каждой из групп, $p < 0,05$.

ботки аргоновой плазмой в течение 1, 3, 5 мин и в контрольной группе. Видно, что гибель клеток наступает спустя несколько часов после воздействия и доля погибших клеток возрастает в течение 72 ч наблюдения. При этом время плазменной обработки не является определяющим фактором для формирования окислительного стресса у клеток. В нашем исследовании показано, что даже кратковременное воздействие низкотемпературной плазмы приводит к гибели исследуемых организмов. В то же время, в отличие от первого опыта, гибель клеток наблюдается только в первые часы после воздействия. Это связано с тем, что образованные радикалы достаточно летучие и не накапливаются в среде и в клетках или повреждения носят поверхностный характер и не являются значительными для процесса деления клеток [12, 13].

Парамеция является живым одноклеточным организмом, поэтому способность к делению напрямую зависит от количества питательных веществ в среде. Это проявляется на 24-й ч после воздействия во всех трех сериях эксперимента. После гибели большого числа особей в среде появляется большое число органических остатков, которые поглощаются выжившими особями, что приводит к быстрому делению. Однако клетки образованные после деления также накапливают в себе активные формы кислорода и подвергаются сильному воздействию, что приводит к необратимым последствиям и нарушениям процессов деления.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о сложном и многофакторном влиянии состава низкотемпературной плазмы на жизнеспособность клеток *P. caudatum*. В то время как воздействие плазменной струи из смеси аргона и воздуха на чистую воду приводит к существенному уменьшению уровня pH, для культуры клеток *P. caudatum* уровень кислотности среды после плазменной обработки практически не изменялся. При этом наиболее стабильное подавление размножения клеток фиксировалось после плазменной обработки в потоке чистого гелия, воздействие которого не вызвало заметного изменения уровня кислотности среды. Данный эффект можно связать с прямым переносом энергии от возбужденных атомов гелия на реализацию биохимических окислительных процессов в клетках. Полученные результаты указывают на возможность использования низкотемпературной плазмы для очистки воды от биозагрязнений, а также для обработки медицинских приборов и рабочих поверхностей.

Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121032500080-8). Исследования проведены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savinov V.P., Yakunin V.G., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Timoshenko V.Y., Riaby V.A. Influence of low-temperature atmospheric pressure plasma on the vital functions of microorganisms // J. Phys. Conf. Ser. 2019. Vol. 1348. N 1: 012007.
2. Kim J., Katsurai M., Kim D., Ohsaki H. Microwave-excited atmospheric-pressure plasma jets using a microstrip line // Appl. Phys. Lett. 2008. Vol. 93. N 19: 191505.
3. Jobiliong E., Suyanto H., Marpaung A.M., Abdulmajid S.N., Idris N, Hedwig R, Ramli M., Pardede M., Suliyanti M.M., Kagawa K., Fukumoto K.-I., Tjia M.O., Lie T.J., Lie Z.S., Kurniawan K.H. Spectral and dynamical characteristics of the plasma emission and its effect on laser-ablated target emission in double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) experiment // Appl. Spectrosc. 2015. Vol. 69. N 1. P. 115–123.
4. Inozemtsev A.N., Karpukhina O.V., Melikhov I.V., Riaby V.A., Savinov V.P., Timoshenko V.Y., Yakunin V.G. Effect of low temperature plasma of atmospheric pressure on single-cell model organisms of ciliate *Paramecium caudatum* // J. Phys. Conf. Ser. 2019. Vol. 1238. N 1: 012050.
5. Canesi L. Pro-oxidant and antioxidant processes in aquatic invertebrates // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2015. Vol. 1340. N 1. P. 1–7.
6. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Karpukhina O.V., Bokieva S.B., Inozemtsev A.N. Biosynthesis of isocitric acid in repeated-batch culture and testing of its stress-protective activity // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. Vol. 103 N 8. P. 3549–3558.
7. Morgunov I.G., Karpukhina O.V., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A., Inozemtsev A.N. Investigation of the effect of biologically active three-Ds-isocitric acid on oxidative stress in *Paramecium caudatum* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2018. Vol. 8. N 4. P. 1–5.
8. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9. N 7. P. 676–682.
9. Fernando W.T.L.S. Study on atmospheric pressure plasma jet for plasma patterning toward cell culturing. Doctoral dissertation. Nagaoka institute of Technology, 2020. 133 pp.
10. Васин А.Е. Адаптация инфузорий *Paramecium multimicronucleatum* к солям некоторых тяжелых металлов // Вестн. СамГУ. ест.-науч. сер. 2006. Т. 7. № 47. С. 12–18.
11. Weisse T., Stadler P. Effect of pH on growth, cell volume, and production of freshwater ciliates, and implications for their distribution // Limnol. Oceanogr. 2006. Vol. 51. N 4. P. 1708–1715.
12. Moniruzzaman R., Rehman M.U., Zhao Q.L., Jawaid P., Takeda K., Ishikawa K., Hori M., Tomihara K., Noguchi K., Kondo T., Noguchi M. Cold atmospheric helium plasma causes synergistic enhancement in cell death with hyperthermia and an additive enhancement with radiation // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. N 1: 11659.
13. Slaveykova V., Sonntag B., Gutiérrez J.C. Europe PMC Funders group stress and protists: No life without stress // Eur. J. Protistol. 2017. Vol. 55. Pt. A. P. 39–49.

Поступила в редакцию 30.07.2021

После доработки 11.10.2021

Принята в печать 20.10.2021

SHORT COMMUNICATION

Effect of low-temperature atmospheric pressure plasma on *Paramecium caudatum* cell culture

G.A. Gruzdev^{1,*}, O.V. Karpukhina^{2,3}, V.G. Yakunin⁴, A.N. Inozemtsev²,
V.P. Savinov⁴, V.Yu. Timoshenko^{5,6,7}, A.A. Kamensky¹

¹Department of Human and Animal Physiology and ²Department of Higher Nervous Activity, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³Semenov Federal Research Center of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Ulitsa Kosygina 4–1, Moscow, 119334, Russia;

⁴Department of Semiconductor Physics and Cryoelectronics and ⁵Department of Low Temperature Physics and Superconductivity, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–2, Moscow, 119234, Russia;

⁶Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 53, Moscow, 119991, Russia;

⁷National Research Nuclear University, Moscow Engineering Physics Institute, Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409, Russia

*e-mail: gleb-neuro.phys@mail.ru

Influence of low-temperature atmospheric pressure plasma generated by a high-resource arc plasmatron in an air mixture with the addition of an inert gas and in pure inert gas on the culture of *Paramecium caudatum* cells was studied. The effect of the plasma composition and the time of its exposure on the level of acidity of the aqueous medium and the nature of cell death was found. The obtained results are discussed taking into account the effect of active radicals formed under the action of a plasma jet, as well as the delayed reaction of cells to plasma exposure.

Keywords: *infusoria, Paramecium caudatum, free radicals, low-temperature plasma, plasmatron, cytotoxic effect*

Funding: Study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032500080-8.

Сведения об авторах

Груздев Глеб Андреевич – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: gleb-neuro.phys@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0161-6347>

Карпухина Ольга Вячеславовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-37; e-mail: karpukhina.msu@yandex.ru

Якунин Валерий Георгиевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры физики полупроводников и криоэлектроники физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-53; e-mail: yug51@bk.ru

Иноземцев Анатолий Николаевич – докт. биол. наук; вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-37; e-mail: a_inozemtsev@mail.ru

Савинов Владимир Павлович – докт. физ.-мат. наук, доц. кафедры физики полупроводников и криоэлектроники физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-53; e-mail: savinov1983@yahoo.com

Тимошенко Виктор Юрьевич – докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры низких температур и сверхпроводимости физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-29-53; e-mail: timoshen@physics.msu.ru

Каменский Андрей Александрович – докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: physiology_human_bio_msu@mail.ru

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 579.222

**Ингибирование автоокисления аскорбата
новыми штаммами молочнокислых бактерий****А.И. Климко* , Т.А. Чердынцева , А.И. Нетрусов , А.Л. Брюханов **

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

*e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Аскорбат натрия является сильным восстановителем и способен вступать в неферментативные реакции с активными формами кислорода. Настоящая работа была посвящена скринингу штаммов молочнокислых бактерий (МКБ) из коллекции кафедры микробиологии (биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова) и отбору наиболее перспективных штаммов, относящихся к родам *Lactobacillus* и *Lactococcus*. Исследовали 16 новых штаммов МКБ на предмет возможного ингибирования их клетками автоокисления аскорбата. Наибольший ингибирующий эффект вызвали следующие штаммы: *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 161 (42,9%), *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 520 (36,6%), *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 508 (33%) и *Lactobacillus paracasei* КМ МГУ 527 (38,1%). Практически не оказали влияния на автоокисление аскорбата штаммы *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146, *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 162, *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, *Lactobacillus paracasei* КМ МГУ 544, *Lactobacillus caucasicus* КМ МГУ 155, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* КМ МГУ 170. Данные штаммы сравнили со штаммами из других коллекций. В частности, большинство штаммов *Lactobacillus plantarum*, а также *Lactobacillus brevis* КМ МГУ 535 (20,7%) из коллекции кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова продемонстрировали более высокую эффективность ингибирования автоокисления аскорбата по сравнению со штаммами лактобацилл из коллекций ATCC и DSMZ. Показано, что данный метод можно использовать в качестве экспресс-теста для выявления общей способности клеток молочнокислых бактерий к противостоению активным формам кислорода и оценки их антиоксидантного статуса. Таким образом, способность к ингибированию автоокисления аскорбата возможно применять в качестве одного из факторов отбора перспективных пробиотических штаммов МКБ.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, молочнокислые бактерии (МКБ), пробиотики, антиоксиданты, автоокисление аскорбата, витамин С

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют во многих ферментационных процессах при приготовлении разнообразных продуктов питания, включающих в себя не только молочные и мясные, но также и овощные продукты. Основной функцией МКБ в этих процессах является синтез молочной кислоты (в качестве основного метаболита), которая снижает рН среды и предотвращает рост гнилостных бактерий. Вторичные метаболиты, такие как уксусная кислота, этанол и экзополисахариды, важны для создания желаемого вкуса и текстуры ферментированных продуктов [1].

Стоит отметить, что МКБ широко применяют и в медицине. Так, употребление пробиотиков способствует улучшению здоровья организма-хозяина [2]. Данные микроорганизмы способны эффективно взаимодействовать с эпителиальными клетками кишечника, что удерживает их в организме хозяина относительно длительное время

и положительно влияет на автохтонную микробиоту желудочно-кишечного тракта [3].

В ходе промышленных биотехнологических процессов МКБ часто подвергаются различным окислительным стрессам, которые возникают из-за накопления активных форм кислорода (АФК) внутри клеток. АФК образуются в результате неполного восстановления молекулярного кислорода до супероксид-радикала ($O_2^{\cdot-}$), пероксида водорода (H_2O_2) или гидроксильного радикала (OH^{\cdot}); они вызывают повреждения клеточных макромолекул (белков, липидов и нуклеиновых кислот), что, в свою очередь, может приводить к подавлению роста микробных культур и последующей гибели клеток [1, 4].

Для нейтрализации токсичных молекул АФК клетки многих организмов, включая человека, синтезируют антиоксидантные ферменты и различные восстановители, которые вместе с антиоксидантами, содержащимися в пище, образуют ба-

рьеры антиоксидантной защиты. Тем не менее, при определенных обстоятельствах такие системы не всегда эффективно защищают клетку от окислительных стрессов. Следовательно, усиление антиоксидантной защиты считается важным фактором в поддержании здоровья человека и профилактике многочисленных болезней, в том числе сердечно-сосудистых [5, 6]. Многие штаммы МКБ обладают хорошо выраженной антиоксидантной активностью и могут быть использованы для производства пробиотических и ферментированных продуктов, которые улучшают общий антиоксидантный статус организма-хозяина [7].

Аскорбиновая кислота (витамин С) относится к ряду жизненно необходимых соединений и широко известна как мощный антиоксидант, восстановитель токсичных свободных радикалов [8]. Витамин С требуется для нормального функционирования соединительной и костной ткани. В частности, он влияет на биосинтез и сохранение коллагена, что важно и для поддержания тонуса желудочно-кишечного тракта [7, 9]. В восстановленной форме аскорбат способствует лучшему усвоению организмом железа, защищает липиды от перекисного окисления, участвует в различных нейрофизиологических процессах [10]. Однако под действием АФК витамин С окисляется, что ведет к потере его функциональных качеств в организме [11]. Поэтому поддержание данного химического вещества в активной форме является очень важным процессом. Пробиотические метаболические виды активности могут оказывать антиоксидантное воздействие путем удаления токсичных окислителей или путем предотвращения их возникновения в кишечнике за счет хелатирования ионов металлов, в частности, Cu(II) и Fe(II), а также снижения активности некоторых ферментов в путях образования АФК. Кроме того, многие пробиотики способствуют сокращению выброса аскорбата (природного восстановителя) и ингибированию его самоокисления. Таким образом, способность МКБ к ингибированию автоокисления аскорбата, относящегося к ряду жизненно необходимых соединений, является одним из их важных пробиотических свойств [9, 12, 13].

По мнению Спиropулоса с соавт. [14], пробиотические штаммы МКБ могут в значительной мере усиливать антиоксидантную защиту клеток хозяина, синтезируя и высвобождая глутатион и аскорбат, которые абсорбируются и распределяются в организме. Способность аскорбата к автоокислению используют для экспериментов по выявлению антиоксидантных свойств у разных микроорганизмов, в том числе и у МКБ. Данный метод позволяет оценить общую способность того или иного штамма к инактивации АФК [15] и, следовательно, определить штаммы, наиболее эффективно препятствующие автоокислению аскорбата, перспективные для дальнейшего использо-

вания в биотехнологии и для изучения клеточных механизмов антиоксидантной защиты.

Ранее нами были исследованы 33 новых штамма МКБ на пробиотические свойства: адгезию, образование биопленок, агглютинацию с конканавалином А, антимикробную активность и т.д. [16]. Для изучения антиоксидантной активности были отобраны штаммы с наиболее высокими показателями вышеперечисленных свойств. Целью данной работы было проанализировать способность молочнокислых бактерий родов *Lactobacillus* и *Lactococcus* из коллекции кафедры микробиологии МГУ подавлять процесс автоокисления аскорбата и отобрать наиболее активные и перспективные для дальнейшей работы штаммы, которые могут быть использованы для производства пробиотических препаратов и продуктов питания.

Материалы и методы

Штаммы МКБ. Эксперимент проводили с использованием 16 новых штаммов молочнокислых бактерий из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Для активирования лиофилизированных культур и их проверки на чистоту в пробирки с лиофилизированными клетками добавляли жидкую питательную среду MRS и высевали на агаризованную среду MRS по методу Коха, растирая шпателем по 5–10 чашкам Петри. Морфологический контроль культур осуществляли просмотром фиксированных и окрашенных метиленовым синим препаратов бактерий под световым микроскопом (увеличение $\times 100$).

Ингибирование клетками МКБ автоокисления аскорбата. Анализ проводили по модифицированному методу Мишры и Ковачича [17]. Бактериальные штаммы культивировали в течение 20 ч в жидкой питательной среде MRS при температуре 37 °С. Клетки три раза промывали 0,2 М фосфатным буферным раствором (рН 7,0). При λ 560 нм измеряли начальную оптическую плотность суспензии клеток и доводили ее до 0,9–1,1 единиц оптической плотности в 3 мл фосфатного буферного раствора. Затем к 4,9 мл фосфатного буферного раствора (рН 7,0) добавляли 50 мкл 5 мМ аскорбата натрия и 50 мкл соответствующей суспензии клеток (в случае контроля – 50 мкл буферного раствора). В течение 30 мин с интервалом в 30 с измеряли оптическую плотность образца при λ 265 нм. Итоговое значение выражали в виде процента ингибирования автоокисления аскорбата (ИАА), которое рассчитывали по формуле, где представлена оптическая плотность образца (раствор аскорбата натрия с суспензией клеток; $A_{\text{образец}}$) и оптическая плотность контроля (раствор аскорбата натрия без суспензии клеток; $A_{\text{контроль}}$):

$$\text{ИАА}\% = \left(1 - \frac{A_{\text{образец}}}{A_{\text{контроль}}} \right) 100\%.$$

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Средние значения и среднеквадратичные отклонения были рассчитаны и отображены в таблице. Эксперименты проводили в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Замедление процесса автоокисления аскорбата в растворе определяется снижением концентрации АФК. Таким образом, чем медленнее аскорбат окисляется, тем эффективнее система антиоксидантной защиты в клетках. Аскорбат натрия используется в качестве стандартной аналитической системы, которая позволяет определить возмож-

ный потенциал устойчивости к АФК у микроорганизмов [13]. В настоящей работе показано, что наиболее эффективно ингибировали автоокисление аскорбата клетки штамма *Lactobacillus plantarum* КМ МГУ 161 (таблица). В целом, способность замедлять автоокисление аскорбата показана для большинства исследованных штаммов рода *Lactobacillus* (10 из 15). Это свидетельствует о том, что многие МКБ, в том числе и из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова, могут эффективно противостоять АФК.

Некоторые исследованные нами штаммы МКБ показали весьма высокий процент ингибирования автоокисления аскорбата. В частности, это относится к ряду новых штаммов лактобацилл

Таблица

Сравнение полученных экспериментальных и литературных [15] данных по ингибированию автоокисления аскорбата натрия клетками МКБ

Штамм из коллекции кафедры микробиологии МГУ	Ингибирование автоокисления аскорбата натрия, %	Штамм (по Амаретти и др. [15])	Ингибирование автоокисления аскорбата натрия, % [15]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	0	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSMZ 23033	20,0
		<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	82,0
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 160	4,0 ± 0,4	<i>Lactobacillus brevis</i> DSMZ 23034	16,0
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 521	15,5 ± 1,6		
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 535	20,7 ± 0,2		
<i>Lactobacillus brevis</i> КМ МГУ 542	11,2 ± 1,1		
<i>Lactobacillus caucasicus</i> КМ МГУ 155	0	—	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> КМ МГУ 571	17,0 ± 1,7	—	
<i>Lactobacillus paracasei</i> КМ МГУ 544	0	—	
<i>Lactobacillus paracasei</i> КМ МГУ 527	38,1 ± 3,8		
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 162	0	<i>Lactobacillus plantarum</i> MB 395	5,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 508	33,0 ± 3,3	<i>Lactobacillus plantarum</i> LN 3	15,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 520	36,6 ± 3,6	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 1	16,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> КМ МГУ 161	42,9 ± 4,3		
<i>Lactobacillus reuteri</i> КМ МГУ 570	17,5 ± 1,7	—	
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> КМ МГУ 529	0	—	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> КМ МГУ 170	0	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	25,0
		<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> ATCC 19257	35,0

Примечание: зеленым цветом выделены штаммы МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, показавшие по данным трех независимых экспериментов лучшую способность к ингибированию автоокисления аскорбата, чем известные по литературным данным штаммы соответствующих видов. Прочерк — отсутствие культур в статье Амаретти и др. для сравнения результатов.

L. plantarum (33,0–42,9%), *L. paracasei* (38,1%) и *L. brevis* (11,2–20,7%). Однако *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* КМ МГУ 170, напротив, не проявил такой активности. В таблице представлены сравнительные результаты с использованием новых штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова и известных штаммов МКБ из различных мировых коллекций микроорганизмов – АТСС, DSMZ и др. [15].

Показано, что многие штаммы МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В. Ломоносова обладают антиоксидантным потенциалом на уровне и даже выше многих известных штаммов (в особенности это относится к *L. plantarum*) и, таким образом, в дальнейшем могут быть использованы для создания эффективных пробиотических антиоксидантных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Terpou A., Papadaki A., Lappa I.K., Kachrimani-dou V., Bosnea L.A., Kopsahelis N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value // *Nutrients*. 2019. Vol. 11. N 7: 1591.
2. Gao D., Gao Z., Zhu G. Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2 // *Food Funct.* 2013. Vol. 4. N 6. P. 982–989.
3. Alp D., Kuleaşan H. Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 35. N 10: 156.
4. Redanz S., Cheng X., Giacaman R.A., Pfeifer C.S., Merritt J., Kreth J. Live and let die: hydrogen peroxide production by the commensal flora and its role in maintaining a symbiotic microbiome // *Mol. Oral Microbiol.* 2018. Vol. 33. N 5. P. 337–352.
5. Mozaffari H., Daneshzad E., Larijani B., Surkan P.J., Azadbakht L. Association of dietary total antioxidant capacity to anthropometry in healthy women: a cross-sectional study // *Nutrition*. 2020. Vol. 69: 110577.
6. Aguilar-Toalá J.E., Garcia-Varela R., Garcia H.S., Mata-Haro V., González-Córdova A.F., Vallejo-Cordoba B., Hernández-Mendoza A. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field // *Trends Food Sci. Technol.* 2018. Vol. 75. P. 105–114.
7. Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria // *J. Appl. Microbiol.* 2007. Vol. 102. N 1. P. 106–115.
8. Njus D., Kelley P.M., Tu Y.-J., Schlegel H.B. Ascorbic acid: the chemistry underlying its antioxidant properties // *Free Radic. Biol. Med.* 2020. Vol. 159. P. 37–43.
9. Azcárate-Peril M.A., Sikes M., Bruno-Bárcena J.M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011. Vol. 301. N 3. P. G401–G424.
10. Rahate K.A., Madhumita M., Prabhakar P.K. Nutritional composition, anti-nutritional factors, pre-treatments-cum-processing impact and food formulation potential of faba bean (*Vicia faba* L.): a comprehensive review // *LWT – Food Sci. Technol.* 2021. Vol. 138: 110796.
11. Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. Vol. 63. N 2. P. 463–468.
12. Hou Y., Li X., Liu X., Zhang Y., Zhang W., Man C., Jiang Y. Transcriptomic responses of Caco-2 cells to *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus plantarum* J26 against oxidative stress // *J. Dairy Sci.* 2019. Vol. 102. N 9. P. 7684–7696.
13. Zhitkovich A. Nuclear and cytoplasmic functions of vitamin C // *Chem. Res. Toxicol.* 2020. Vol. 33. N 10. P. 2515–2526.
14. Spyropoulos B.G., Misiakos E.P., Fotiadis C., Stoidis C.N. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis // *Dig. Dis. Sci.* 2011. Vol. 56. N 2. P. 285–294.
15. Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97. N 2. P. 809–817.
16. Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2020. Vol. 12. N 3. P. 1139–1148.
17. Mishra O.P., Kovachich G.B. Inhibition of the autoxidation of ascorbate and norepinephrine by extracts of *Clostridium butyricum*, *Megasphaera elsdenii* and *Escherichia coli* // *Life Sci.* 1984. Vol. 35. N 8. P. 849–854.

Поступила в редакцию 09.09.2021

После доработки 31.10.2021

Принята в печать 15.11.2021

SHORT COMMUNICATION

Inhibition of ascorbate autoxidation by new strains of lactic acid bacteria

A.I. Klimko* , T.A. Cherdyntseva , A.I. Netrusov , A.L. Bryukhanov 

Microbiology Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: alenaklimko221@yandex.ru

Sodium ascorbate is a strong reducing agent able to participate in non-enzymatic reactions with reactive oxygen species. The research work was dedicated to screening of lactic acid bacteria (LAB) strains from the Collection of Microorganisms of the Department of Microbiology (Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University) and to selection of the most promising strains belonged to genera *Lactobacillus* and *Lactococcus*. We have investigated the ability to inhibit the ascorbate autoxidation by cells of 16 new strains of LAB from the Collection of Microorganisms of the Department of Microbiology, Lomonosov Moscow State University (CM MSU). *Lactobacillus plantarum* CM MSU 161 (42.9%), *Lactobacillus plantarum* CM MSU 520 (36.6%), *Lactobacillus plantarum* CM MSU 508 (33%) and *Lactobacillus paracasei* CM MSU 527 (38.1%) had the greatest inhibitory effect on ascorbate autoxidation. *Lactobacillus acidophilus* CM MSU 146, *Lactobacillus plantarum* CM MSU 162, *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529, *Lactobacillus paracasei* CM MSU 544, *Lactobacillus caucasicus* CM MSU 155, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CM MSU 170 had no detectable effect on inhibition of ascorbate autoxidation. These strains were compared with strains from other collections. In particular, the majority of *Lactobacillus plantarum* strains as well as *Lactobacillus brevis* CM MSU 535 (20.7%) from the CM MSU demonstrated a higher percentage of inhibition of ascorbate autoxidation compared with the strains from the ATCC and the DSMZ collections. We have shown that this method can be used as an express testing to reveal the general ability of lactic acid bacterial cells to resist reactive oxygen species and to assess their antioxidant status. Thus, the ability to inhibit autoxidation of ascorbate can be used as one of the potential positive factors for selection of probiotics among LAB.

Keywords: *Lactobacillus*, lactic acid bacteria (LAB), probiotics, antioxidants, ascorbate autoxidation, vitamin C

Funding: The work was carried out within the framework of the state task on the topic of the Department of Microbiology of MSU “Physiology and Biochemistry of Phototrophic and Chemotrophic Microorganisms” (CITIS number 121032300094-7).

Сведения об авторах

Клишко Алена Игоревна – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23, e-mail: alenaklimko221@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6188-6525>

Чердынцева Татьяна Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-45, e-mail: taniacherd@yandex.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8764-0200>

Нетрусов Александр Иванович – докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-83, e-mail: anetrusov@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>

Брюханов Андрей Леонидович – канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23, e-mail: brjuchanov@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1807-297X>

**УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ
«ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. СЕРИЯ 16. БИОЛОГИЯ» В 2021 ГОДУ**

От редактора

№ Стр.

Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. Стоит ли преподавать студентам-биологам основы наукометрии и правила оформления научных статей, а если стоит, то зачем? 3 103

Обзоры

Гусев А.А., Захарова О.В., Васюкова И.А., Евтушенко Н.А., Васильева С.Г., Лукьянов А.А., Лобакова Е.С., Скрипникова Е.В., Соловченко А.Е. Наночастицы в водной среде: риски и возможности их контроля с помощью микроводорослей..... 4 202

Кузьмин В.С., Каменский А.А. Молекулярные механизмы онтогенеза ритмоводителя сердца у позвоночных животных 4 183

Оригинальные исследования

Андреева Т.В., Любителев А.В., Малюченко Н.В., Студитский В.М., Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Влияние линкерной ДНК на структуру нуклеосом по данным флуоресцентной микроскопии одиночных частиц 3 142

Боздагян М.Е., Орехов Ф.С., Литвинов Д.С., Новоселецкий В.Н. Молекулярное моделирование HR2- и трансмембранного доменов префузионного S-белка вируса SARS-CoV-2 3 155

Борзых А.А., Швецова А.А., Кузьмин И.В., Буравков С.В., Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Роль активных форм кислорода в регуляции тонуса артерий дыхательной и локомоторной мышц крысы 3 134

Горшкова Д.С., Пожидаева Е.С. Влияние фитогормонов на экспрессию генов *USP* в проростках *Arabidopsis thaliana* 4 241

Граф А.В., Байжуманов А.А., Маслова М.В., Крушинская Я.В., Маклакова А.С., Соколова Н.А., Каменский А.А. Активность антиоксидантной системы при беременности в норме и при гипоксии 3 126

Закалюкина Ю.В., Зайцев А.Р., Бирюков М.В. Оценка целлюлозоразрушающей активности актинобактерий, ассоциированных с муравьями..... 1 24

Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Влияние ингибиторов циклооксигеназы эторикоксиба и диклофенака натрия, а также их комбинаций с мексидолом на поведение крыс..... 3 148

Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Васильчук А.Г., Воронина Т.А. Способность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей..... 2 61

Киселевский Д.Б., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П., Самуилова О.В., Самуилов В.Д. Действие низкомолекулярного хитозана на клетки эпидермиса из листьев гороха..... 1 18

Лазарева А.М., Ипатов В.И., Ильина О.В., Тодоренко Д.А., Маторин Д.Н., Байжуманов А.А. Токсическое влияние микрочастиц пластика на культуру *Scenedesmus quadricauda*: взаимодействие между микрочастицами пластика и водорослью..... 4 225

Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К. Особенности использования 2,6-дихлорофенолиндофенола в качестве акцептора электронов в исследованиях фотосинтеза..... 4 234

Михальский А.И., Анисимов В.Н., Жаринов Г.М. Анализ продолжительности жизни человека в исторической перспективе 3 118

Мишуков А.А., Бережнов А.В., Кобякова М.И., Евстратова Я.В., Мндлян Е.Ю., Холмухамедов Э.Л. Действие противоопухолевого препарата ONC201 на число митохондриальных нуклеоидов в культуре клеток рака молочной железы BT474..... 3 110

Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А. Влияние пептидов KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) и KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) на параметры гемостаза, липидный профиль, уровень глюкозы крови и изменение массы тела крыс на фоне метаболического синдрома и дисфункции эндотелия..... 1 10

<i>Нестерова Л.Ю., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i> Влияние индола на содержание клеточных полиаминов и антибиотикочувствительность <i>Escherichia coli</i>	4	219
<i>Новиков Р.В., Грибкова А.К., Качер Ю.Г., Зайцев П.А., Армеев Г.А., Глухов Г.С., Шайтан А.К.</i> Дизайн биосенсоров нуклеиновых кислот на основе систем CRISPR/Cas и репортерных сплит-белков.....	2	67
<i>Подунай Ю.А., Давидович О.И., Давидович Н.А.</i> Репродуктивная совместимость европейских популяций у двух видов <i>Ulnaria (Bacillariophyta)</i>	2	76
<i>Роговая О.С., Зупник А.О., Измайлова Л.Ш., Воротеляк Е.А.</i> Морфофункциональная характеристика фибробластов папиллярного и ретикулярного слоев дермы кожи человека.....	4	250
<i>Роккина А.Н., Праведникова А.Э., Шидловский Ю.В., Попова Е.В., Задорожная Л.В., Хомякова И.А.</i> Индексы подкожного и висцерального жираотложения и их связь с комплексом эндогенных и экзогенных факторов в группе взрослого населения Республики Алтай.....	1	33
<i>Сивкина А.Л., Феофанов А.В., Кирпичников М.П., Ахтар М.С., Студитский В.М.</i> Роль белка Nhrb в разворачивании нуклеосом фактором FACT	4	213
<i>Тарасова Е.О., Хоткина Н.А., Гайдуков А.Е., Базелина О.П.</i> Потенциация спонтанной секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы под действием 2-арахидоноилглицерина и анандамида	1	3
<i>Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В.</i> Калиевые токи входящего выпрямления IK1 и IKACH в рабочем миокарде японского перепела (<i>Coturnix japonica</i>).....	2	83
<i>Широкых И.Г., Назарова Я.И.</i> Актинобиота ризосферы трансгенных растений табака с повышенной солеустойчивостью	4	258
<i>Шумов Д.Е., Ткаченко О.Н., Яковенко И.А., Дорохов В.Б.</i> Стационарный слуховой ответ на музыку на основе бинауральных биений во время дневного сна	2	55

Мнения

<i>Куликов А.В., Архипова Л.В.</i> Тестостерон и продолжительность жизни, или почему женщины живут дольше мужчин. Гипотеза	3	163
<i>Хохлов А.Н.</i> Размышления геронтолога-пессимиста, или почему мы все еще не живем 1000 лет.....	4	266

Краткие сообщения

<i>Груздев Г.А., Карпущина О.В., Якунин В.Г., Иноземцев А.Н., Савинов В.П., Тимошенко В.Ю., Каменский А.А.</i> Влияние низкотемпературной плазмы атмосферного давления на культуру клеток <i>Paramecium caudatum</i>	4	273
<i>Климко А.И., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И., Брюханов А.Л.</i> Ингибирование автоокисления аскорбата новыми штаммами молочнокислых бактерий.....	4	278
<i>Контаров Н.А., Долгова Е.И., Погарская И.В., Контарова Е.О., Юминова Н.В.</i> Кинетика термоинактивации вируса гриппа A/BANGKOK/1/1979(H3N2) в присутствии полиаллиламина	1	41
<i>Осмоловский А.А., Шмидт Л., Орехова А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.</i> Воздействие протеиназы <i>Aspergillus fumigatus</i> на белки плазмы крови.....	2	90
<i>Чжан Х., Глухов Г.С., Пустовит К.Б., Качер Ю.Г., Русинова В.С., Киселева И.И., Комолятова В.Н., Макаров Л.М., Заклязьминская Е.В., Соколова О.С.</i> Фенотипические проявления миссенс-мутации Val93Ile и ее влияние на функционирование канала Kir2.1	3	169

Erratum

Исправление в статье «Клетки китайского хомячка в биотехнологических и геронтологических исследованиях»	1	47
Исправление в статье «Способность мексидола усиливать антиэкссудативное действие диклофенака натрия и эторикоксиба на модели каррагенанового отека у крыс и мышей».....	3	175

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская – в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии составляет 0,924, показатель CiteScore 2020 (Scopus) англоязычной версии – 1,3.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подт-верждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал – полусторонний, отступ – 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается [шаблон статьи](#)). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объёмы, значительно отклоняющиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера

Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово «введение» не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2021. Т. 76. № 4

литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение – нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке: «Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹*Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

²*Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia*

**e-mail: kolosova@mail.ru*

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович – канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и приставленного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (инициалы после фамилии). Название тезисов // Название сборника тезисов (как на обложке сборника). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (инициалы после фамилии). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.

7) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition // Cell. 2021. Vol. 184. N 3. P. 596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes // PloS One. 2020. Vol. 15. N 4: e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости // Комп. исслед. моделир. 2020. Т. 12. № 6. С. 1383–1395.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.

Рязанова Г.И. Поведение насекомых. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile // Plant stem cells. Methods in molecular biology, vol. 2094 / Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana, 2020. P. 39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

Тезисы докладов (материалы) конференции:

Болеева Г.С., Борзых А.А. Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.

Автореферат диссертации:

Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.02.2021).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК, аргинин – Арг, валин – Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов – обычным шрифтом. Например: ген – *FOXO3*, его продукт – FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7–10 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Полезные ссылки

Список сокращённых названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)