

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 77 • № 2 • 2022 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Соловченко А.Е., Ткачев Е.Н., Цуканова Е.М., Шурыгин Б.М.,
Хрушев С.С., Конюхов И.В., Птушенко В.В.
Зимний покой древесных растений и его неинвазивный мониторинг 51

Фрайкин Г.Я. Фотосенсорные и сигнальные свойства криптохромов 65

Швецова А.А., Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Каналы TASK-1:
функциональная роль в гладкомышечных клетках артерий 76

Оригинальные исследования

Еникеев Р.Р., Татарина Н.Ю., Захарчук Л.М., Виноградова Е.Н.
Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам
у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов,
полученных из медицинского учреждения 89

Ловягина Е.Р., Давлетшина Л.Н., Семин Б.К. Особенности окисления
катионов Mn(II) в мембранных препаратах фотосистемы 2
без кислород-выделяющего комплекса. Эволюционный аспект 98

Граф А.В., Байжуманов А.А., Маслова М.В., Крушинская Я.В.,
Маклакова А.С., Соколова Н.А., Каменский А.А.
Влияние острой гипоксии на разных сроках гестации
на показатели окислительного стресса у потомства крыс. 104

Воробьева Н.В., Вахлярская С.С., Черняк Б.В. Роль изоформ
протеинкиназы C в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек 112

Орлов Н.А., Якимов С.А., Некрасова О.В., Феофанов А.В.
Рекомбинантные пептиды Ce1 и Ce4 из яда скорпиона *Centruroides elegans*
и их взаимодействие с гибридными каналами KcsA-KV1.X ($x = 1, 3, 6$). 122

Прокудина О.И. Сравнительное исследование динамики
материнского поведения крыс Вистар и крыс линии ГК
с предрасположенностью к кататоническим реакциям 130

Краткие сообщения

Осмоловский А.А., Шаш Б., Александрова А.В., Баранова Н.А.,
Крейер В.Г. Оценка спектра протеолитической активности микромицетов
рода *Aspergillus* по отношению к белкам системы гемостаза 138

CONTENTS

Reviews

- Solovchenko A.E., Tkachyov E.N., Tsukanova E.M., Shuryhin B.M.,
Khrushev S.S., Konyukhov I.V., Ptushenko V.V.
Winter dormancy of woody plants and its non-invasive monitoring. 51
- Fraikin G.Ya. Photosensory and signaling properties of cryptochromes 65
- Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S. TASK-1 channels:
functional role in arterial smooth muscle cells 76

Research articles

- Yenikeyev R.R., Tatarinova N.Y., Zakharchuk L.M., Vinogradova E.N.
Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics in strains of bacteria
of the genus *Bacillus* isolated from samples obtained from a medical institution 89
- Lovyagina E.R., Davletshina L.N., Semin B.K. Peculiarities of Mn(II) cation
oxidation in the photosystem II without oxygen-evolving complex.
Evolutionary aspect 98
- Graf A.V., Baizhumanov A.A., Maslova M.V., Krushinskaya Ya.V.,
Maklakova A.S., Sokolova N.A., Kamensky A.A. The effect of acute hypoxia
at different gestation periods on markers of oxidative stress in rat's offspring 104
- Vorobjeva N.V., Vakhlyarskaya S.S., Chernyak B.V. The role of protein kinase C
isoforms in the formation of neutrophil extracellular traps. 112
- Orlov N.A., Yakimov S.A., Nekrasova O.V., Feofanov A.V.
Recombinant peptides Ce1 and Ce4 from venom of scorpion *Centruroides elegans*
and their interactions with hybrid channels KcsA-Kv1.x (x = 1, 3, 6) 122
- Prokudina O.I. A comparative study of dynamics of maternal behavior in Wistar rats
and rats selected for predisposition to catatonic reactions (GC rats) 130

Short communications

- Osmolovsky A.A., Şaş B., Aleksandrova A.V., Baranova N.A., Kreyer V.G.
Evaluation of the spectrum of proteolytic activity of micromycetes
of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system 138

ОБЗОР

УДК 57.045

Зимний покой древесных растений и его неинвазивный мониторинг

А.Е. Соловченко^{1, 2, *} , Е.Н. Ткачев³, Е.М. Цуканова³, Б.М. Шурыгин¹,
С.С. Хрущев⁴ , И.В. Конюхов⁴, В.В. Птушенко^{5, 6} 

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

²Институт естествознания, Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина, Россия, 392000, г. Тамбов, ул. Интернациональная, д. 33;

³Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина, Россия, 393760, г. Мичуринск, ул. Мичурина, д. 30;

⁴Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁵Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;

⁶Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, Российская академия наук, Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

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

В состоянии покоя (dormancy) многолетние растения — обитатели регионов с выраженной сезонностью климата — могут переживать длительные периоды неблагоприятных условий. Выделяют периоды предварительного, физиологического и вынужденного покоя. В период предварительного покоя завершаются генетические, физиолого-биохимические и морфологические перестройки, увеличивающие стресс-толерантность растения. Физиологический или глубокий покой характеризуется неспособностью меристем к возобновлению деления клеток даже в благоприятных условиях. Под действием сигналов окружающей среды растения переходят от глубокого покоя к вынужденному, в котором деление клеток и рост сдерживается неблагоприятными условиями среды. Участвовавшие климатические флуктуации приводят к аномальному выходу из покоя, повышая риск повреждения растений, особенно культурных, неблагоприятными факторами среды. В этой связи важны методы неинвазивного объективного мониторинга состояния покоя растений в реальном времени. Исследования связи между статусом покоя и функционированием фотосинтетического аппарата растений привели к разработке методов мониторинга состояния древесных растений путем регистрации переменной флуоресценции хлорофилла хвои и эндодермы коры их побегов. В обзоре кратко суммированы современные представления о механизме индукции состояния покоя и выхода из него. Приводится анализ функционирования и регуляции фотосинтетического аппарата в покое, связи между амплитудно-кинетической характеристикой индукции флуоресценции хлорофилла и глубиной покоя многолетних растений. Обсуждаются проблемы интерпретации сигналов флуоресценции хлорофилла в контексте мониторинга покоя, а также возможности практического использования этого подхода.

Ключевые слова: покой растений, физиологический покой, вынужденный покой, флуоресценция хлорофилла, нефотохимическое тушение, неинвазивный мониторинг

В ходе эволюции многолетние растения, обитающие в регионах с выраженной сезонной сменой климатических условий, выработали ряд адаптаций для переживания длительных периодов с неблагоприятными условиями (холодного сезона) [1–3]. Одной из ключевых адаптаций для выживания в холодное время года является период покоя (dormancy), характеризующийся минимальной интенсивностью жизнедеятельности растений [4, 5]. Период зимнего покоя характерен как

для зимнезеленых, так и для листопадных растений. Хотя явление покоя растений привлекает внимание ученых уже более 100 лет [6], вокруг связанной с периодом покоя терминологии идет оживленная полемика [2, 7]. Одно из наиболее универсальных определений состояния покоя [8] предлагает считать его «...неактивным состоянием меристем и (или) способных к росту органов, в котором рост не возобновляется даже в благоприятных условиях до тех пор, пока это состояние не бу-

дет изменено сигналами окружающей среды» [7, 9]. В покое растения характеризуются высокой толерантностью к действию неблагоприятных факторов среды, в частности, низких температур. Таким образом, согласованная с сезонными изменениями климата ритмика вхождения в покой и выхода из него обеспечивает максимальную сохранность тканей побегов, вегетативных и генеративных почек в холодный период года [3, 6].

Период зимнего покоя принято делить на три фазы, наиболее выраженные у растений умеренного климатического пояса. Вначале растения вступают в фазу предварительного покоя (предпокоя, *pre-dormancy*). В период предварительного покоя завершаются генетические, физиолого-биохимические и морфологические перестройки, увеличивающие стресс-толерантность растения [10]. Эти изменения в известной степени обратимы, поскольку возможна индукция вторичного роста выдерживанием растений на удлинённом фотопериоде, внесении высоких доз азотных удобрений, а также шокowymi воздействиями — дефолиацией, сильной обрезкой или обильным увлажнением. Предварительный покой переходит в физиологический или глубокий покой (*endo-dormancy*), препятствующий росту даже в благоприятных условиях. Наблюдается снижение оводнённости побегов и рост водоудерживающей способности [11]. При этом толерантность к действию неблагоприятных условий среды увеличивается до максимума, у листопадных видов наблюдается осеннее старение и опадение листьев [10, 12]. Под действием низких температур в холодное время года растения переходят из глубокого покоя в состояние вынужденного покоя (*eco-dormancy*), в котором рост сдерживается только неблагоприятными климатическими условиями. Точные механизмы поддержания покоя неизвестны, но выдвигается ряд гипотез об их природе [1, 13–15]. При наступлении тёплого сезона возобновляется рост, стресс-толерантность снижается до уровня, предшествующего вступлению в покой.

Особенностью зимнего покоя является его количественный, «дозозависимый» характер, выражающийся в зависимости глубины и длительности покоя от интенсивности и времени воздействия факторов среды [10]. Величина минимально необходимого для выхода из глубокого покоя воздействия низких температур (*chilling requirement*, CR — часы экспозиции растения при температурах в диапазоне 0–7 °C [5]) характеризуется внутри- и межвидовой изменчивостью и считается одной из адаптаций к региональным климатическим особенностям; разработаны математические модели для её расчёта [5]. В качестве регуляторов покоя многолетних древесных растений рассматривали как внутренние (циркадные ритмы, гормональные сигналы), так и внешние (фотопериод, температура, интенсивность солнечной

радиации, водный режим) стимулы [8, 10, 16]. Однако механизмы и факторы входа растений в покой, а также выхода из глубокого покоя (*dormancy release*) остаются во многом неясными.

Пристальное внимание исследователей к явлению зимнего покоя обусловлено практической важностью этого явления для растениеводства, в особенности плодоводства в регионах с неблагоприятными климатическими условиями (в т. н. зонах рискованного садоводства). С одной стороны, критически важно поддержание покоя в период нестабильных температур и в межсезонье, поскольку преждевременно вышедшие из покоя растения уязвимы для холодового повреждения. С другой стороны, глобальное потепление приводит к риску недостаточности холодового воздействия и, как следствие, к нарушению ритмики прохождения фенологических фаз. Данная проблема стала особенно актуальной в последние годы в связи с дестабилизацией климатических условий и учащением флуктуаций гидротермического режима промышленных садов, вызывающих аномальное протекание периода покоя у растений [5]. Понимание закономерностей влияния резких изменений климатических условий на состояние растений при вступлении в период покоя, в покое и при выходе из него позволило бы спланировать меры по смягчению негативных последствий этих явлений. Данная проблема особенно остра в нынешнюю эпоху климатической нестабильности.

В этой связи актуально определение тенденций изменения ритмики прохождения периода покоя и вероятности раннего цветения в период, когда высок риск заморозков. Не менее важен и подбор сортов с адекватным местным климатическим условиям уровнем зимостойкости (а значит, и объективная количественная, но при этом неинвазивная оценка зимостойкости). Для решения этой задачи оптимальны высокопроизводительные неинвазивные экспресс-методы. К такому относится метод регистрации и анализа амплитудно-кинетических характеристик переменной флуоресценции хлорофилла или РАМ (*pulse-amplitude modulation*), широко применяемый при высокопроизводительном фенотипировании растений [17–20]. Предварительные исследования показали техническую осуществимость измерений индукционных кривых флуоресценции хлорофилла *a* (ФХ) фотосистемы II, была охарактеризована сезонная динамика фотосинтетической активности хлорофиллоносных тканей побегов дикорастущих и культурных древесных растений [21–23]. Реализация этих методов на современном уровне техники обеспечит круглогодичный автоматизированный сбор данных о функционировании фотосинтетического аппарата и их анализ в реальном времени одновременно с регистрацией климатических условий. Одна-

ко для уверенной интерпретации полученных результатов в контексте исследований зимнего покоя необходимо более глубокое понимание взаимосвязи ритмики покоя растений с состоянием их фотосинтетического аппарата.

С учетом сказанного в обзоре кратко суммированы современные представления о механизмах зимнего покоя растений и выхода из него. Рассматриваются особенности функционирования и регуляции фотосинтетического аппарата растений в покое и возможности их неинвазивного анализа по амплитудно-кинетической характеристике индукции ФХ. В заключении обсуждаются проблемы и возможности практического использования этого подхода.

**Факторы окружающей среды —
детерминанты периода покоя**

Согласно общепринятым представлениям, вступление в состояние покоя происходит под действием сигналов окружающей среды. В классической [2, 3, 6, 24] и современной [1, 13, 15] литературе накоплен значительный объем сведений о феноменологии регуляции ритмики и глубины покоя внешними факторами, среди которых ключевыми являются низкие температуры, короткий фотопериод и их комбинации. Вопрос о том, какой из перечисленных факторов главный, активно обсуждается в литературе и, по-видимому, ответ на него разный в зависимости от вида растения (таблица). Большинству видов древесных растений требуется воздействие обоих факторов, причем как для достижения максимальной холодоустойчивости, так и для выхода из покоя [25, 26]. Необходимость действия обоих факторов особенно характерна для растений, произрастающих в регионах с теплым климатом [27, 34].

Кроме того, укорочение фотопериода сначала индуцирует вход растения в состояние покоя,

и лишь позже развивается холодоустойчивость. Понижение температуры приводит к обратному порядку развития этих двух реакций растения — сначала возникает холодоустойчивость, а позже растение переходит в состояние покоя [37]. Возможно, что с этим различием действия короткого дня и низких температур связаны и различия в механизмах индукции покоя между длинно- и короткодневными растениями [37]. В целом, эффект сокращения длины дня обратим на ранних стадиях прекращения роста: для возобновления роста достаточно вернуть растения к длинному дню [38].

Главным сенсором изменений фотопериода является фитохромная система листа [39, 40], запускающая синтез белка VSP (vegetative storage proteins) [41] — один из признаков входа в покой [41]. Выраженность ответов на вариацию фотопериода зависит от географической широты происхождения растения: северные экотипы более чувствительны к сокращению длины дня, их критический фотопериод длиннее, т.е. при сокращении длины дня северные экотипы раньше прекращают рост и переходят к покою, чем южные [31], однако известны исключения из этого правила [42]. Более того, даже при непрерывном освещении и высокой температуре некоторые виды вступают в состояние покоя, хотя и с опозданием [24].

Восприятие холодовых сигналов и ответы на них изучены намного хуже, чем у фотопериодических сигналов. Интересная гипотеза связывает ритмику покоя древесных растений с нарушением работы «молекулярного осциллятора», контролирующего циркадную ритмику, при действии низких температур и сокращении светового дня [10]. Ключевые исследования соответствующих механизмов были выполнены с использованием модельного травянистого растения — арабидопсиса Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), работ по древесным растениям существенно меньше.

Таблица

Факторы окружающей среды, влияющие на вход растений в глубокий покой

Виды растений	Действующий фактор		Ссылки
	Фотопериод	Низкие температуры	
Голосеменные (Pinophyta)			
<i>Pinus sylvestris</i> L.	+++*	+++	[32]
<i>Picea glauca</i> (Moench) Voss	+++	+++	[32]
<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst.	+++	+++	[32]
Покрытосеменные (Magnoliophyta)			
<i>Castanea sativa</i> Mill.	++	+++	[10]
<i>Betula pendula</i> Roth.	+++*	+++	[28, 31]
<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.	++	+++	[31]
<i>Salix parvifolia</i> C.K. Schneid. ssp	+++*	+++	[35]
<i>Populus tremula</i> L. × <i>tremuloides</i> Michx.	+++	+	[36]
<i>Malus pumila</i> Mill.	++	+++	[27–30]
<i>Pyrus communis</i> L.	++	+++	[27–30]
<i>Vitis vinifera</i> L.	+++	+++	[33]

Примечание: * — ключевой фактор, ** — второстепенный фактор, *** — маловажный фактор

Однако полученные на модельных видах результаты важны для понимания регуляторных механизмов, присутствующих у многих видов, в том числе — у древесных растений. Так, на примере *A. thaliana* было показано, что циркадный осциллятор модулирует холодовые сигналы, экспрессию белков семейства CBF (C repeat-binding factor) и передачу низкотемпературных Ca^{2+} -сигналов [43]. При наступлении холодного сезона циркадный осциллятор останавливается, запуская изменения экспрессии ряда генов (см. ниже), которые приводят, в итоге, к вступлению в покой [44]. Интересно, что для выхода из покоя отдельных видов, таких как абрикос японский (*Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc.), важнее суммарный эффект высоких, а не низких температур в летний период [45]. Сходный эффект наблюдается при стрессовых воздействиях, таких как преждевременная дефолиация, орошение после засухливого периода и применение химических препаратов, прекращающих покой [46, 47].

Генетический контроль периода покоя

Даже в отсутствие изменений морфологии покоящихся побегов и почек в них существенно изменяются процессы метаболизма и уровни экспрессии определенных генов. При этом наблюдаются сходные изменения экспрессии генов в различных органах и тканях, что может свидетельствовать об универсальности молекулярных механизмов индукции и регуляции покоя. Наиболее характерные изменения, выявленные в геномных исследованиях, предложено использовать в качестве молекулярного индикатора периода покоя [13].

Анализ локусов количественных признаков (ЛКП), связанных с прохождением периода покоя у гибридов тополя волосистоплодного (*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray ex. Hook.) и тополя дельтовидного (*P. deltoides* W. Bartram ex Marshall), показал, что различия в организации генетического контроля ответов на изменение фотопериода лишь частично объясняют различия темпов закладки почек, наблюдаемые в полевых условиях [48]. Для построения более полной картины необходимо учитывать воздействие других факторов, таких как температура. Однако известно, что CR также является комплексным количественным признаком, определяющим, среди прочего, время цветения у представителей рода *Prunus* L., включая миндаль (*P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb), абрикос (*P. armeniaca* L.), персик (*P. persica* (L.) Batsch) и черешню (*P. avium* (L.) L.) [13]. Некоторые ЛКП, связанные с CR, включают одни и те же ортологичные области генома, что также может свидетельствовать об универсальности молекулярных механизмов этого процесса [49]. Так, геномные исследования более 400 генотипов персика выявили тесную связь CR с ЛКП, локализованным на хромосоме 1 [50]. Именно

в этой области располагаются шесть tandemных повторов с генами *dam1-6*. Кластер генов *dam* (dormancy associated mads-box), кодирующих факторы транскрипции, ранее был картирован как локус *evg* (evergrowing) [13, 15]. Фенотипическое проявление сверхэкспрессии гена *dam6* — ингибирование роста, сходное с таковым при вступлении в покой. Делеция четырех из шести генов *dam* приводит к потере способности к остановке роста в зимний период [15, 51].

Эксперименты с варьированием фотопериода и температур показали, что гены *dam* связаны с сезонным прекращением роста побегов и образованием генеративных почек в конце лета [15]. Экспрессия *dam1-dam6* регулируется длиной дня, достигая максимума при переходе в глубокий покой и снижается в течение холодного сезона [52]. Паттерны экспрессии генов кластера *dam* позволяют предположить их участие в поддержании состояния глубокого покоя [15]. Также считается, что в регуляции прохождения покоя участвуют гены *svl* (short vegetative phase-like), гомологи генов *dam*. Оба семейства регулируются рядом факторов транскрипции, гормонами, а также эпигенетически [53]. Предполагается, что факторы транскрипции *teosinte branched1* снижают экспрессию *dam5* и *dam6* и тем самым приводят к окончанию глубокого покоя.

Сильное охлаждение влияет на метаболизм гормонов (см. ниже) и активирует гены семейств *dam*, *flowering locus C-like* (*flc*), *flowering locus T* (*ft*) и *terminal flower 1*. Происходит обогащение транскриптома продуктами генов, контролирующими постэмбриональное развитие, а также — *early flowering 7*, *raf10*, *zep4* и *F-box*, которые могут быть вовлечены в регуляцию выхода из покоя. Воздействие холода регулирует связанные с фитогормонами пути и постэмбриональное развитие при вскрытии почек. В этом задействована реципрокная регуляция двух локусов *ft* и *flc*, ответственных за цветение. После долгого периода холода подавляется экспрессия *flc*, снимается репрессия *ft*, и растение может цвести. Наиболее подробно представленность и регуляция данных генов изучена у модельных травянистых растений, в частности, у арабидопсиса, но гомологи этих генов найдены и в геномах некоторых изученных к настоящему времени древесных растений. Так, описана эпигенетическая регуляция экспрессии этих генов с участием изменений в метилировании ДНК и гистонов, упаковке хроматина и путей регуляции клеточного цикла. Соответствующие механизмы связаны с взаимодействием гистонов с промотором, вторым экзоном и вторым интроном гена *dam6*, а также с протяженными вставками в интронах *dam5* и *dam6* у персика и яблони [13, 52].

Среди генов, вовлеченных в регуляцию покоя, упоминаются гены, экспрессия которых регулируется

ется уровнем гормонов и абиотическими стрессорами: гены, кодирующие циклин D и стабилизирующие структуру макромолекул дегидрины. Экспрессия дегидринов связана с регуляцией покоя [12] и закалкой, белки CRF2 (cytokinin response factor 2), CAP160 (catabolite activator protein), а также белки семейства LEA (late embryogenesis abundant), связанные с ответами на холодовой стресс [54, 55]. Как правило, сокращение длины светового дня и снижение температуры усиливают экспрессию этих белков, после чего она постепенно репрессируется в течение холодного сезона. Низкие температуры синергически усиливают действие изменения фотопериода [52, 56]. Получены свидетельства участия гена-ортолога впервые описанного у арабидопсиса репрессора цветения *sup* (Short Vegetative Phase) в процессе передачи фотопериодического сигнала и сигнала абсцизовой кислоты (АБК) у гибрида осины и тополя осинообразного (*P. tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) [57]. Снижение экспрессии *sup* нарушает состояние покоя. Напротив, сверхэкспрессия этого гена устраняет нарушения покоя при мутациях, вызывающих нечувствительность к абсцизовой кислоте.

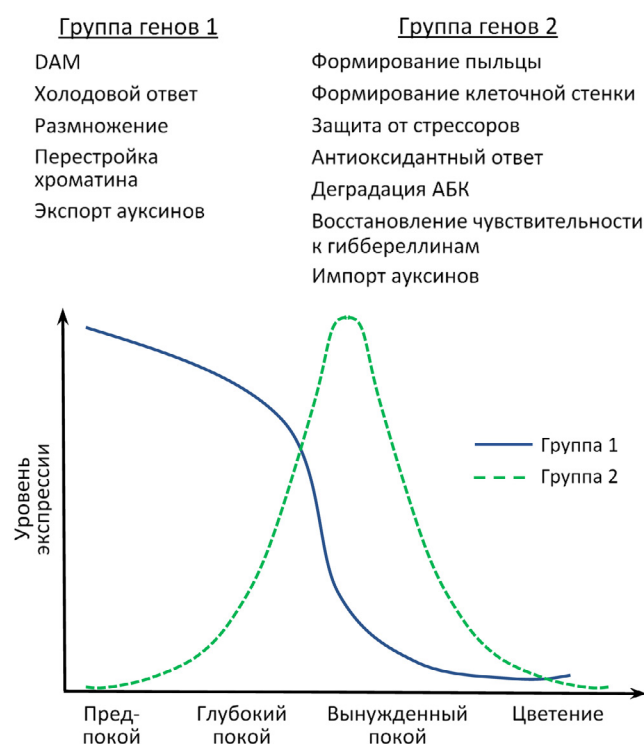


Рис. 1. Гипотетическая динамика экспрессии генов при смене фаз покоя растений. При вступлении в покой глобальный уровень экспрессии генов постепенно снижается и достигает минимума в глубоком покое, а при переходе к вынужденному покою снова временно увеличивается. При этом можно выделить две группы генов с контрастными показателями экспрессии. Предполагается, что гены из первой группы отвечают за «аккумуляцию эффекта холода» и выход из глубокого покоя, а гены второй группы — за созревание генеративных почек и подготовку к выходу из покоя (подробнее см. работу Ю и соавт. [13]).

Белки CBF связываются с геномной ДНК перед генами *dam*, индуцируя транскрипцию последних [58]. Сверхэкспрессия генов, кодирующих CBF-белки у персика, замедляет распускание почек, повышает экспрессию генов семейства *lea* и иных генов, например, кодирующих белки COR (Cold-Responsive), экспрессия которых активируется низкими температурами и вызывает акклимацию к действию холода [59, 60]. Тем не менее, однозначных подтверждений участия LEA- и COR-белков в индукции и поддержании состояния покоя, а не только в формировании толерантности к действию низких температур, пока нет.

На основании полученных к настоящему времени экспериментальных данных был предложен гипотетический механизм индукции глубокого покоя, в котором снижение температуры воздуха индуцирует транскрипцию CBF-факторов, а те повышают экспрессию генов *dam* и блокируют передачу сигналов гиббереллинов [13]. Длительное действие низких температур приводит к постепенному снижению экспрессии генов *CBF* и *DAM*, и, как следствие, к выходу из глубокого покоя (рис. 1).

Гормональные сигналы и покой растений

Гормоны-ингибиторы роста ранее рассматривались как первопричина покоя, при этом знания о механизмах их действия в контексте прохождения покоя остаются в значительной степени фрагментированными и противоречивыми, несмотря на большое число исследований, посвященных этому вопросу [8]. Современные исследования указывают на вероятную роль гиббереллинов и АБК в регуляции покоя почек [61]. Сокращение светового дня индуцирует у древесных растений снижение содержания гиббереллинов, коррелирующее с замедлением роста и остановкой деления клеток в субапикальной меристеме побегов [62]. Напротив, обработка гиббереллинами верхушечных почек, воспринявших сигнал короткого дня, приводит к возобновлению деления клеток их апикальных меристем.

Были предложены гипотетические механизмы поддержания покоя, такие как блокирование поступления ростостимулирующих гормонов в клетки меристем. Так, в период глубокого покоя происходит обособление клеток апикальных меристем за счет нарушения проводимости плазмодесм. В апикальных почках проводимость плазмодесма нарушается за счет накопления в них каллозы. Была выдвинута гипотеза о том, что гиббереллины восстанавливают межклеточные контакты, открывая запечатанные каллозой поры, что необходимо для передачи иных химических сигналов и выхода растений из покоя [63].

Известно также, что сокращение светового дня сопровождается снижением экспрессии гена, кодирующего GA-20-оксидазу — ключевой фермент

биосинтеза гиббереллинов [62]. И наоборот, выход из глубокого покоя сопровождается ростом экспрессии генов GA-20-оксидазы у *P. mume*. Снижение экспрессии GA-2-оксидазы, превращающей гиббереллины в неактивную форму, повышает содержание активной формы этих гормонов, таких как GA₃, после выхода из глубокого покоя [64]. Не исключено, что регуляция периода покоя гиббереллинами может координироваться фитохромной системой. Так, вышеописанный эффект не наблюдался у растений гибридного тополя с увеличенной экспрессией гена *phyA* [65]. Таким образом, ингибирование биосинтеза гиббереллинов вносит свой вклад в ответ на фотопериодический сигнал (остановка роста). У тополя содержание гиббереллинов повышалось по мере действия низких температур [44].

В отличие от транспорта гиббереллинов, транспорт ауксинов не нарушается при разрыве межклеточных контактов. Последний осуществляется специализированными переносчиками, транскрипты которых обнаруживаются и в покоящихся клетках. При входе в покой и выходе из него уровень ауксина в камбиальных клетках остается прежним, однако меняется чувствительность тканей к этому гормону [10]. По другим данным, наблюдается значительный рост концентрации ауксинов в период вынужденного покоя [66]. В пользу последнего предположения свидетельствует снижение экспрессии экспортирующих ауксины белков-транспортёров на фоне индукции транспортёров, отвечающих за импорт молекул этих гормонов. Интересно, что при выходе из глубокого покоя усиливается транскрипция целого семейства малых ауксин-отзывчивых РНК (small auxin up RNA, SAUR). В настоящее время считается, что именно транспорт ауксинов играет роль «переключателя», регулирующего период покоя у яблони [67]. Действительно, один из генов транспортёров ауксинов у персика (*Prupe.1G07180*) оказался связанным с ЛКП *qCR1d-2008*, контролирующим «накопление» холодового сигнала.

Абсцизовая кислота — ингибитор роста и стимулятор опадения листьев [63, 68], участвующий в индукции покоя, накапливаясь в почках при коротком дне. Разрыв межклеточных контактов через плазмодесмы также является одним из эффектов АБК [61, 69]. Предполагается, что изменения в состоянии покоя теснее связаны с изменениями восприимчивости к АБК, чем с изменениями ее концентрации. Сведения о роли АБК остаются противоречивыми. Так, при сокращении светового дня наблюдается рост содержания этого гормона, однако обработка растений экзогенной АБК не вызвала индукции покоя [31]. Сокращение светового дня индуцировало вхождение в покой даже у форм березы повислой (*Betula pendula* Roth), дефицитных по синтезу АБК, но эти растения имели сниженную толерантность к действию низких

температур по сравнению с диким типом [31, 69]. У тополя белого (*Populus alba* L.) сокращение длины светового дня и снижение температур также вызывают опосредованный повышением концентрации АБК рост экспрессии гена *SVL*, потенциально вовлеченного в контроль покоя и распускания почек [70]. Сверхэкспрессия гена *DAM6* из *P. mume* в растениях яблони низкой (*Malus pumila* Mill.) задерживает распускание почек посредством повышения уровня АБК и снижения содержания цитокинина [14]. В итоге было признано, что АБК участвует скорее в фотопериодической регуляции устойчивости к низким температурам, чем в индукции глубокого покоя [12]. В целом эти результаты свидетельствуют о независимом характере индукции покоя и закладки «спящих» почек при модуляции обоих процессов фотопериодом и уровнем этилена (см. далее) [71]. В выводковых почках ряски (*Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid) фотосинтез и физиологические процессы, связанные с их прорастанием, как предполагают, также находятся под контролем АБК [72].

Этилен, газообразный «гормон старения», также принимает участие в регуляции прохождения покоя совместно с другими гормонами. Влияние этилена на ритмику прохождения покоя изучали на трансгенных растениях березы, не восприимчивых к действию этого гормона вследствие экспрессии аберрантного гена рецептора этилена *ETR1* из арабидопсиса с доминантно-негативной мутацией *etr1-1* [73]. При сокращении длины светового дня у таких растений замедлялся рост, но не наблюдалась закладка верхушечных почек. Аналогичные данные получены на гибридных растениях тополя (*P. tremula* × *P. alba*) со сверхэкспрессией гена-гомолога *ABI3* [71, 73].

Структурно-функциональные перестройки фотосинтетического аппарата в период покоя

Адаптация растений к низкой температуре в значительной степени направлена на поддержание баланса между поглощенной энергией света и метаболическими потребностями клеток в фотоассимилятах [74, 75]. В связи с этим растения повышают емкость метаболического стока и (или) снижают фотохимическую эффективность фотосинтетического аппарата клеток [76–78]. Параллельно при входе в покой в клетке могут происходить изменение пропорций фотосинтетических пигментов, рост содержания ненасыщенных жирных кислот в мембранах, накопление моно- и олигосахаридов, синтез криопротекторных белков, рост вязкости цитоплазмы и изменения в структуре фотосинтетического аппарата [78–80]. В то же время, для достижения баланса между поглощенной и используемой энергией света хвойные вечнозеленые растения используют поддержание высокофункциональной фотосистемы (ФС) I, через которую происходит диссипация из-

бытка поглощенной энергии при низких температурах [75, 78]. Полагают, что это один из ключевых факторов, определяющих доминирование хвойных в высоких широтах [81].

Так, *Picea obovata* Ledeb. и *Abies sibirica* Ledeb. быстрее выходят из зимнего покоя, чем *Pinus sibirica* Du Tour и *P. sylvestris* L., но вследствие этого фотосинтетический аппарат *A. sibirica* может повреждаться весенними заморозками. Это различие связано с тем, что вышеупомянутые виды используют разные механизмы реактивации фотосинтеза весной. У сосны в течение зимы снижается производительность системы ассимиляции CO₂, и в начале весны активируется альтернативный (зависимый от белков Proton Gradient Regulation, PGR5 и PGRL1) сток электронов через ФС1 до восстановления ассимиляции CO₂. К концу весны содержание PGR5 в хвое сосны снижается, вместе с ним снижается интенсивность транспорта электронов через ФС1, возрастает транспорт через ФС2, а интенсивность ассимиляции CO₂ возрастает. Наряду с контролируемым и гибко регулируемым содержанием PGR5, фотосинтетический аппарат сосны использует также и другой путь увеличения стока с ФС1 – зависящий от железосодержащих флавопротеинов [81].

В отличие от сосны, растения ели не обладают способностью переключаться между разными стоками электрона в течение года, в результате чего страдают от фотоокислительного повреждения в весенний период [82]. Как следствие, величина переменной флуоресценции хлорофилла *a*, F_v/F_m, снижается у ели при похолоданиях сильнее, чем у сосны. Видимо, это различие стратегий сосны и ели связано с их разными экологическими стратегиями: сосна – пионер в заселении нарушенных местообитаний, а ель – теневыносливое растение поздних стадий сукцессии [81]. По мере индукции покоя и приобретения холодоустойчивости (закалки) при наступлении морозов в фотосинтетический аппарат сосны происходит частичная потеря компонента антенны ФС2 – белка CP43, а также накопление белка PsbS, участвующего в защите путем тепловой диссипации избытка поглощенной световой энергии [83]. Существенно, что и потеря CP43, и накопление PsbS происходят на ранней стадии закалки, когда начинает укорачиваться фотопериод и понижается температура. Структурно-функциональные перестройки фотосинтетического аппарата хвойных растений при наступлении зимнего покоя детально суммированы в обзоре Ченг и соавт. [84] (рис. 2).

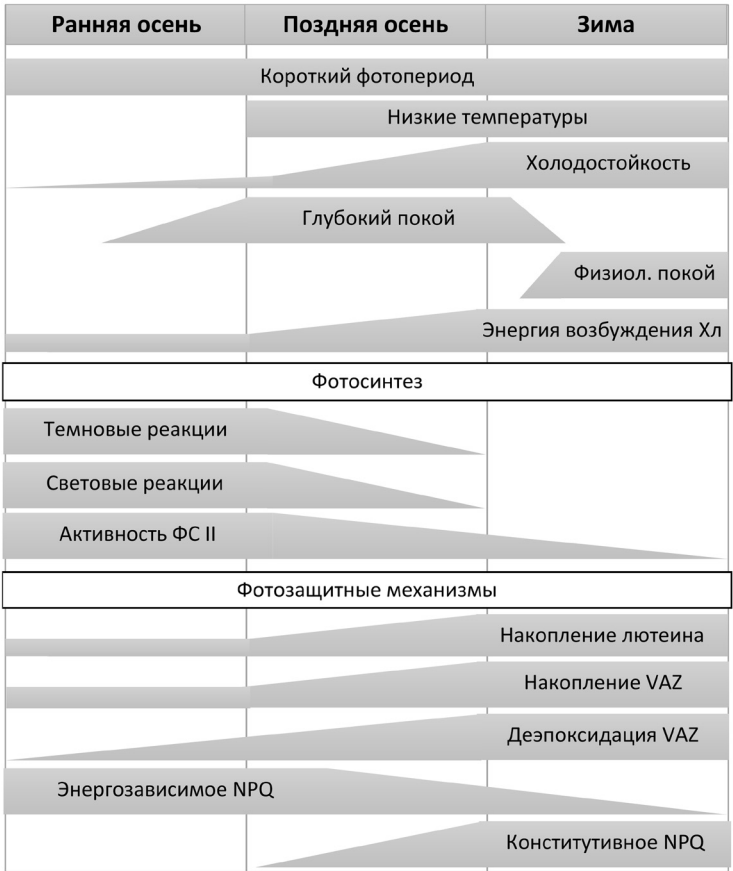


Рис. 2. Обобщенная последовательность событий при холодовой акклимации фотосинтетического аппарата и индукции покоя у хвойных деревьев. Короткий фотопериод и низкие температуры осенью вызывают прекращение роста, замедление фотосинтеза и развитие холодостойкости. Снижение фотохимической утилизации поглощенной энергии света запускает фотозащитные механизмы, включая накопление и дезпоксидацию пигментов виолаксантинового цикла (VAZ), переход от энергозависимого к конститутивному нефотохимическому тушению (NPQ) (по Ченг с соавт. [84]).

Исследований динамики фотосинтетического аппарата при входе в покой на листопадных растениях существенно меньше, чем на хвойных. На растениях персика обыкновенного (*P. persica*) были изучены причины снижения скорости фотосинтеза при входе в состояние покоя [37]. Данные дифференциальной протеомики показали, что фотосинтез лимитировали ключевые белки углеводного цикла — Рубиско и фосфоенолпируваткарбоксилаза, содержание которых снижалось при входе в покой. В листьях наблюдалась ферментативная деградация этих ферментов, которая проходила глубже и быстрее при коротком дне, чем при длинном.

Интересным примером могут служить выводковые почки (турионы) водных растений, таких как многокоренник обыкновенный (*Spirodela polyrrhiza*), которые содержат развитый фотосинтетический аппарат, но зимуют в темноте [72]. Падение величины F_v/F_m у *S. polyrrhiza* в период покоя происходит за счет снижения максимальной флуоресценции, F_m , и роста минимальной, F_o . При этом возрастает уровень нерегулируемого тушения, $Y(NO)$, а регулируемое тушение, $Y(NPQ)$, наоборот, снижается. Данный ответ можно считать необычным, поскольку одновременно сильно возрастает уровень дезпокидации ксантофиллов виолаксантинового цикла, но абсолютное содержание этих пигментов не увеличивается [72].

Возможности неинвазивного мониторинга состояния покоя

Как следует из анализа литературы, представленного выше, физиолого-биохимические перестройки при входе растений в глубокий покой и выходе из него сопровождаются значительными изменениями функционирования фотосинтетического аппарата. В свою очередь, эти изменения отражаются на амплитудно-кинетических параметрах индукции ФХ, измерения которой широко применяются для анализа и мониторинга физиологического состояния растений [85, 86]. Так, установлено, что изменения переменной ФХ, F_v/F_m , и продуктивности фотосинтеза при входе в покой имеют двухфазный характер: первая фаза индуцируется укорочением светового дня, вторая — понижением температуры. Развитие методологии РАМ-флуориметрии хлорофилла позволило эффективно использовать переменную флуоресценцию для регистрации зимнего покоя хвойных [87]. В настоящее время тестирование физиологического статуса проростков в посадках древесных растений является обычной практикой в различных регионах США, Канады, Швеции, Великобритании. Оно имеет цель количественно охарактеризовать внутренние параметры, такие как общая устойчивость к стрессам, холодоустойчивость, статус состояния покоя, а также детектировать латентные повреждения, не заметные нево-

оруженным глазом. Однако, насколько известно авторам данного обзора, проанализировать эффекты покоя отдельно от таковых эффектов низкой температуры и (или) интенсивности солнечного излучения пока не удалось.

Наряду с классическими методами [37], здесь используется метод индукции ФХ. Важным шагом в развитии применений индукции ФХ для мониторинга зимнего покоя стало измерение этого процесса в побегах, а не только в листьях, что обусловило применимость данной методики и к листопадным растениями в холодный период года [42, 88]. Так, слой феллодермы в коре древесных растений содержит хлоропласты и обладает фотосинтетической активностью. Это делает возможным круглогодичный мониторинг состояния фотосинтетического аппарата [21]. Таким образом, мониторинг ФХ принципиально позволяет отслеживать динамику вхождения растений в состояние зимнего покоя, степень холодового повреждения растений зимой и выхода из покоя весной. Однако использование этого подхода связано с некоторыми сложностями в интерпретации динамики сигналов ФХ. Так, снижение максимального уровня ФХ, F_m , связывают как с ростом толерантности к холоду, так и с акклимацией к дневному свету. Так, на 20-летних растениях *Fagus sylvatica* L. установлено, что листья и стебли показывают одинаковый ход изменений F_v/F_m в весенне-летний период, хотя F_v/F_m обычно немного ниже в побегах (0,78 по сравнению с 0,81) [88]. Показано также, что параметры индукции ФХ (F_v/F_m) побегов являются индикатором холодоустойчивости и степени повреждения камбия клонов ивы (*Salix viminalis* L. и *S. dasyclados* Wimm.) [89]. У сосны обыкновенной и у ели обыкновенной, несмотря на существенные различия в их механизмах акклимации к низкой температуре, F_v/F_m следует за температурой [90]; при этом у *P. sylvestris* снижение F_v/F_m можно использовать для предсказания холодоустойчивости [91]. Показано, что для растений, обладающих различной холодоустойчивостью, характерны разные зависимости F_v/F_m от температуры. Так, для позднецветущих сортов миндаля (*P. dulcis*) с выраженной восприимчивостью к заморозкам было обнаружено линейное уменьшение F_v/F_m с температурой, а для раннецветущих сортов того же вида, устойчивых к низким температурам, наблюдалась квадратичная кривая с точкой перегиба при $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ [92]. Однако более чувствительным, чем F_v/F_m , является реальный (operating) квантовый выход ФС2, т.к. он может быстро меняться [93], в то время как снижение F_v/F_m может быть детектировано только на глубоких стадиях заделки или зимнего стресса [94].

Можно заключить, что изучение температурной зависимости параметров ФХ способно дать алгоритм выявления холодоустойчивых растений, но параметры динамики ФХ, специфичные для

наступления и окончания периода глубокого покоя, не выявлены до сих пор. Тем не менее, существуют гипотезы о механизмах модуляции ФХ в период зимнего покоя. Одна из них постулирует, что атрибутом покоя является нарушение межсистемного транспорта электронов из-за инактивации либо повреждения пластохинонового пула [95]). Более поздние предположения связывают физиологическую пластичность хвойных, в том числе в период покоя, с индукцией высокого, медленно релаксирующего уровня нефотохимического тушения, NPQ (non-photochemical quenching). В качестве механизмов упоминаются фосфорилирование тилакоидных белков и более интенсивная индукция виолаксантинового цикла (см. соответствующие работы [96, 97] и ссылки в этих работах). Одним из потенциальных индикаторов состояния покоя является метод регистрации термолюминесценции. Еще на ранних стадиях закаливания растения, когда лишь начинается фотопериод, снижается температура В-полосы термолюминесценции игл *P. sylvestris* (возможно, это говорит об усилении рекомбинации зарядов в ФС2, обеспечивающем дополнительную защиту от фотоповреждения [98]). Очевидно, однако, что поиск надежных индикаторов для неинвазивного мониторинга состояния покоя растений необходимо продолжать.

Заключение

В настоящем обзоре суммированы современные представления о механизмах индукции и регуляции различных фаз зимнего покоя у древесных растений и их фенотипические проявления на уровне фотосинтетического аппарата. Даже из столь краткого рассмотрения очевидно, что зимний покой представляет собой комплексное явление, динамика которого обусловлена суперпозицией сигналов окружающей среды (фотопериод и температурный режим), путей их восприятия и передачи, а также ответов растения на эти сигналы.

Последние достижения техники регистрации и теории анализа сигналов ФХ открывают новые возможности для мониторинга ритмики и глубины зимнего покоя. Размещение множества автономных датчиков ФХ, связанных в вычислительное «облако» через беспроводные телекоммуникационные каналы, позволяет вести мониторинг состояния растений в покое с беспрецедентным временным разрешением как в природных, так и в антропогенных экосистемах.

Основные проблемы применения данной методики в настоящее время связаны с недостаточным пониманием фундаментальных механизмов зимнего покоя и отсутствием независимых методов, позволяющих оперативно оценивать статус покоя растений. По-прежнему нет четкого критерия для выявления перехода растений от глубоко-

го покоя к вынужденному, не ясно даже, является ли этот переход плавным или дискретным. Для этой цели по-прежнему применяют, в основном, традиционные методики (отращивание срезанных побегов, анатомо-гистохимические методы). В последнее время обсуждаются эпигенетические и «омиксные» подходы [10, 13], однако пока они не могут считаться достаточно универсальными и селективными. Так, для доказательства участия выявленных к настоящему времени генов-кандидатов в регуляции покоя растений необходимы более детальные профили экспрессии для сопоставления с фенотипическими данными, характеризующими глубину и фазу покоя. При этом критически важным является высокое временное разрешение фенотипирования. Перспективным для решения этой задачи подходом можно признать использование состояния фотосинтетического аппарата молодых побегов как «внутреннего зонда», отражающего метаболическую активность тканей, очевидно, связанную с глубиной покоя растений. Многообещающей кажется возможность использования недавно разработанной методологии зондирования растений с помощью ФХ, индуцированной солнечным светом, SIF (solar-induced fluorescence) [99].

Очевидна необходимость дополнительных исследований для выявления связей между различными проявлениями покоя на морфологическом, генетическом и физиолого-биохимическом уровнях (включая регуляцию диссипации поглощенной энергии света в фотосинтетическом аппарате). В частности, необходимы критерии, позволяющие отличать картину сравнительно долговременной индукции фотозащитных механизмов (таких как NPQ) при вхождении в покой от «оперативной» акклимации к действию стрессоров, таких как свет высокой интенсивности и (или) низкие температуры. В этой связи важна проблема выбора наиболее информативных параметров ФХ, отражающих статус покоя растений. Можно также думать, что подробная регистрация динамики состояния фотосинтетического аппарата в течение длительных периодов времени, сопоставимых по протяженности с фазами покоя, позволит применить математические методы для устранения «высокочастотных помех», вызванных суточными колебаниями температуры воздуха и освещенности.

Результаты получены с использованием ресурсов Центра коллективного пользования ТГУ имени Г.Р. Державина. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта по соглашению № 075-15-2021-709 (уникальный идентификатор проекта RF — 2296.61321X0037). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Withers P., Cooper C. Dormancy // Encyclopedia of ecology, vol. 3 / Ed. B.D. Fath. Elsevier, 2018. P. 309–314.
2. Генкель П.А., Окнина Е.З. О физиологии состояния покоя и способах его диагностики // Физиология состояния покоя у растений / Под. ред. А. Прокофьева. М.: Наука, 1968. С. 29–54.
3. Нестеров Я.С. Период покоя плодовых культур. М.: Сельхозиздат, 1962. 152 с.
4. Camproy J.A., Ruiz D., Egea J. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: a review // Sci. Hort. 2011. Vol. 130. N 2. P 357–372.
5. Luedeling E. Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review // Sci. Hort. 2012. Vol. 144. N 6. P. 218–229.
6. Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 352 с.
7. Considine M.J., Considine J.A. On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants // J. Exp. Bot. 2016. Vol. 67. N 11. P. 3189–3203.
8. Rohde A., Bhalerao R.P. Plant dormancy in the perennial context // Trends Plant. Sci. 2007. Vol. 12. N 5. P. 217–223.
9. Bewley J.D. Seed germination and dormancy // The Plant Cell. 1997. Vol. 9. N 7. P. 1055–1066.
10. Allona I., Ramos A., Ibáñez C., Contreras A., Casado R., Aragoncillo C. Molecular control of winter dormancy establishment in trees: a review // Span. J. Agric. Res. 2008. Vol. 6. P. 201–210.
11. Saito T., Tuan P.A., Katsumi-Horigane A., Bai S., Ito A., Sekiyama Y., Ono H., Moriguchi T. Development of flower buds in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) from late autumn to early spring // Tree Physiol. 2015. Vol. 35. N 6. P. 653–662.
12. Arora R., Rowland L.J., Tanino K. Induction and release of bud dormancy in woody perennials: a science comes of age // HortScience. 2003. Vol. 38. N 5. P. 911–921.
13. Yu J., Conrad A.O., Decroocq V., Zhebentyayeva T., Williams D.E., Bennett D., Roch G., Audergon J.-M., Dardick C., Liu Z., Abbott A.G., Staton M.E. Distinctive gene expression patterns define endodormancy to ecodormancy transition in apricot and peach // Front. Plant Sci. 2020. Vol. 11: 180.
14. Yamane H., Wada M., Honda C., Matsuura T., Ikeda Y., Hirayama T., Osako Y., Gao-Takai M., Kojima M., Sakakibara H. Overexpression of *Prunus* DAM6 inhibits growth represses bud break competency of dormant buds and delays bud outgrowth in apple plants // PLoS One. 2019. Vol. 14. N 4: e0214788.
15. Moser M., Asquini E., Miolli G.V., Weigl K., Hanke M.-V., Flachowsky H., Si-Ammour A. The MADS-box gene MdDAM1 controls growth cessation and bud dormancy in apple // Front. Plant Sci. 2020. Vol. 11: 1003.
16. Maurya J.P., Bhalerao R.P. Photoperiod- and temperature-mediated control of growth cessation and dormancy in trees: a molecular perspective // Ann. Bot. 2017. Vol. 120. N 3. P. 351–360.
17. Demidchik V.V., Shashko A.Y., Bandarenka U.Y., Smolikova G.N., Przhivalskaya D.A., Charnysh M.A., Pozhnyanov G.A., Barkosvkiy A.V., Smolich I.I., Sokolik A.I., Yu M., Medvedev S.S. Plant phenomics: fundamental bases software and hardware platforms and machine learning // Russ. J. Plant Physiol. 2020. Vol. 67. N 3. P. 397–412.
18. McAusland L., Atkinson J.A., Lawson T., Murchie E.H. High throughput procedure utilising chlorophyll fluorescence imaging to phenotype dynamic photosynthesis and photoprotection in leaves under controlled gaseous conditions // Plant Meth. 2019. Vol. 15: 109.
19. Jin X., Zarco-Tejada P., Schmidhalter U., Reynolds M.P., Hawkesford M.J., Varshney R.K., Yang T., Nie C., Li Z., Ming B., Xiao Y., Xie Y., Li S. High-throughput estimation of crop traits: a review of ground and aerial phenotyping platforms // IEEE Geosci. Remote Sens. Mag. 2020. Vol. 9. N 1. P. 200–231.
20. Watt M., Fiorani F., Usadel B., Rascher U., Muller O., Schurr U. Phenotyping: new windows into the plant for breeders // Annu. Rev. Plant Biol. 2020. Vol. 71. P. 689–712.
21. Alekseev A., Matorin D., Osipov V., Venediktov P. Investigation of the photosynthetic activity of bark phelloderm of arboreal plants using the fluorescent method // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2007. Vol. 62. N 4. P. 164–170.
22. Tikhonov K.G., Khristin M.S., Klimov V.V., Sundireva M.A., Kreslavski V.D., Sidorov R.A., Tsidendambayev V.D., Savchenko T.V. Structural and functional characteristics of photosynthetic apparatus of chlorophyll-containing grape vine tissue // Russ. J. Plant Physiol. 2017. Vol. 64. N 1. P. 73–82.
23. Perks M.P., Monaghan S., O'Reilly C., Osborne B.A., Mitchell D.T. Chlorophyll fluorescence characteristics performance and survival of freshly lifted and cold stored Douglas fir seedlings // Ann. Forest Sci. 2001. Vol. 58. N 3. P. 225–235.
24. Samish R. Dormancy in woody plants // Annu. Rev. Plant Physiol. 1954. Vol. 5. P. 183–204.
25. Ritchie G.A. Effect of freezer storage on bud dormancy release in Douglas-fir seedlings // Can. J. Forest Res. 1984. Vol. 14. N 2. P. 186–190.
26. Colombo S., Raitanen E. Frost hardening in white cedar container seedlings exposed to intermittent short days and cold temperatures // For. Chron. 1991. Vol. 67. N 5. P. 542–544.
27. Heide O., Prestrud A. Low temperature but not photoperiod controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear // Tree Physiol. 2005. Vol. 25. N 1. P. 109–114.
28. Heide O. High autumn temperature delays spring bud burst in boreal trees counterbalancing the effect of climatic warming // Tree Physiol. 2003. Vol. 23. N 13. 931–936.
29. Heide O.M. Interaction of photoperiod and temperature in the control of growth and dormancy of *Prunus* species // Sci. Hort. 2008. Vol. 115. N 3. P. 309–314.
30. Cook N.C., Bellen A., Cronjé P.J., De Wit I., Keulemans W., Van den Putte A., Steyn W. Freezing temperature treatment induces bud dormancy in 'Granny Smith' apple shoots // Sci. Hort. 2005. Vol. 106. N 2. P. 170–176.
31. Li C., Junttila O., Heino P., Palva E.T. Low temperature sensing in silver birch (*Betula pendula* Roth) ecotypes // Plant Sci. 2004. Vol. 167. N 1. P. 165–171.
32. Christersson L. The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus silvestris* and *Picea abies* // Physiol. Plant. 1978. Vol. 44. N 3. P. 288–294.
33. Wake C.M., Fennell A. Morphological physiological and dormancy responses of three *Vitis* genotypes to short photoperiod // Physiol. Plant. 2000. Vol. 109. N 2. P. 203–210.
34. Соловченко А.Е., Ткачев Е.Н., Цуканова Е.М., Шурьгин Б.М., Хрущев С.С., Конохов И.В., Птушенко В.В.

Фотосинтетическая активность древесных растений в период зимнего покоя и ее неинвазивный мониторинг // Цифровизация агропромышленного комплекса: Сборник научных статей II международной научно-практической конференции / Под ред. Д.Ю. Муромцева и др. Тамбов: Издательский центр ФГБОУ ВО «ТГТУ», 2020. С. 352–355

35. Li C., Wu N., Liu S. Development of freezing tolerance in different altitudinal ecotypes of *Salix paraplesia* // Biol. Plant. 2005. Vol. 49. N 1. P. 65–71.

36. Jeknić Z., Chen T.H.H. Changes in protein profiles of poplar tissues during the induction of bud dormancy by short-day photoperiods // Plant Cell Physiol. 1999. Vol. 40. N 1. P. 25–35.

37. Zhang H.-S., Li D.-M., Tan Q.-P., Gao H.-Y., Gao D.-S. Photosynthetic activities C3 and C4 indicative enzymes and the role of photoperiod in dormancy induction in 'Chunjie' peach // Photosynthetica. 2015. Vol. 53. N 2. P. 269–278.

38. Junttila O. Apical growth cessation and shoot tip abscission in *Salix* // Physiol. Plant. 1976. Vol. 38. N 4. P. 278–286.

39. Knott J.E. Effect of a localized photoperiod on spinach // Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci. 1934. Vol. 31. P. 152–154.

40. Garner W., Allard H. Further studies in photoperiodism: the response of the plant to relative length of day and night // Science. 1922. Vol. 55. N 1431. P. 582–583.

41. Coleman G.D., Chen T.H., Ernst S.G., Fuchigami L. Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation // Plant Physiol. 1991. Vol. 96. N 3. P. 686–692.

42. Wilson B.C., Jacobs D.F. Chlorophyll fluorescence of stem cambial tissue reflects dormancy development in *Juglans nigra* seedlings // New Forests. 2012. Vol. 43. N 5–6. P. 771–778.

43. Fowler S.G., Cook D., Thomashow M.F. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1 2 and 3 is gated by the circadian clock // Plant Physiol. 2005. Vol. 137. N 3. P. 961–968.

44. Druart N., Johansson A., Baba K., Schrader J., Sjödin A., Bhalerao R.R., Resman L., Trygg J., Moritz T., Bhalerao R.P. Environmental and hormonal regulation of the activity–dormancy cycle in the cambial meristem involves stage-specific modulation of transcriptional and metabolic networks // Plant J. 2007. Vol. 50. N 4. P. 557–573.

45. Kitamura Y., Yamane H., Yukimori A., Shimo H., Numaguchi K., Tao R. Blooming date predictions based on Japanese apricot 'Nanko' flower bud responses to temperatures during dormancy // HortScience. 2017. Vol. 52. N 3. P. 366–370.

46. Erez A. Bud dormancy; phenomenon problems and solutions in the tropics and subtropics // Temperate fruit crops in warm climates / Ed. A. Erez. Dordrecht: Springer, 2000. P. 17–48.

47. Erez A. Chemical control of budbreak // HortScience. 1987. Vol. 22. N 6. P. 1240–1243.

48. Frewen B.E., Chen T.H., Howe G.T., Davis J., Rohde A., Boerjan W., Bradshaw H. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus* // Genetics. 2000. Vol. 154. N 2. P. 837–845.

49. Dirlwanger E., Quero-Garcia J., Le Dantec L., Lambert P., Ruiz D., Dondini L., Illa E., Quilot-Turion B., Audergon J.M., Tartarini S. Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits flowering and

maturity dates in three *Prunus* species: peach apricot and sweet cherry // Heredity. 2012. Vol. 109. N 5. P. 280–292.

50. Li S., Tan Q., Sun M., Xu G., Li C., Fu X., Li L., Gao D., Li D. Protein changes in response to photoperiod during dormancy induction in peach leaves and flower buds // Sci. Hort. 2018. Vol. 239. P. 114–122.

51. Bielenberg D.G., Wang Y.E., Li Z., Zhebentyayeva T., Fan S., Reighard G.L., Scorza R., Abbott A.G. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation // Tree Genet. Genomes. 2008. Vol. 4. N 3. P. 495–507.

52. Leida C., Conesa A., Llacer G., Badenes M.L., Ríos G. Histone modifications and expression of DAM6 gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar-dependent manner // New Phytol. 2012. Vol. 193. N 1. P. 67–80.

53. Cattani A.M., Sartor T., da Silveira Falavigna V., Porto D.D., Silveira C.P., de Oliveira P.R.D., Revers L.F. The control of bud break and flowering time in plants: contribution of epigenetic mechanisms and consequences in agriculture and breeding // Advances in Botanical Research, vol. 88 / Eds. M. Mirouze, E. Bucher, and P. Gallusci. Elsevier, 2018. P. 277–325.

54. Pedrosa A.M., Martins C.d.P.S., Goncalves L.P., Costa M.G.C. Late embryogenesis abundant (LEA) constitutes a large and diverse family of proteins involved in development and abiotic stress responses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) // PloS One. 2015. Vol. 10. N 12: e0145785.

55. Kaye C., Neven L., Hofig A., Li Q.-B., Haskell D., Guy C. Characterization of a gene for spinach CAP160 and expression of two spinach cold-acclimation proteins in tobacco // Plant Physiol. 1998. Vol. 116. N 4. P. 1367–1377.

56. Puhakainen T., Hess M.W., Mäkelä P., Svensson J., Heino P., Palva E.T. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. 2004. Vol. 54. N 5. P. 743–753.

57. Singh R.K., Miskolczi P., Maurya J.P., Bhalerao R.P. A tree ortholog of SHORT VEGETATIVE PHASE floral repressor mediates photoperiodic control of bud dormancy // Curr. Biol. 2019. Vol. 29. N 1. P. 128–133.

58. Xie Y., Chen P., Yan Y., Bao C., Li X., Wang L., Shen X., Li H., Liu X., Niu C. An atypical R2R3 MYB transcription factor increases cold hardiness by CBF-dependent and CBF-independent pathways in apple // New Phytol. 2018. Vol. 218. N 1. P. 201–218.

59. Chinnusamy V., Zhu J.-K., Sunkar R. Gene regulation during cold stress acclimation in plants // Plant stress tolerance. Methods in molecular biology (Methods and protocols), vol. 639 / Ed. R. Sunkar. Humana Press, 2010. P. 39–55.

60. Artlip T., McDermaid A., Ma Q., Wisniewski M. Differential gene expression in non-transgenic and transgenic "M. 26" apple overexpressing a peach CBF gene during the transition from eco-dormancy to bud break // Hort. Res. 2019. Vol. 6: 86.

61. Tylewicz S., Petterle A., Marttila S., Miskolczi P., Azeez A., Singh R.K., Immanen J., Mähler N., Hvidsten T.R., Eklund D.M. Photoperiodic control of seasonal growth is mediated by ABA acting on cell-cell communication // Science. 2018. Vol. 360. N 6385. P. 212–215.

62. Eriksson M.E., Moritz T. Daylength and spatial expression of a gibberellin 20-oxidase isolated from hybrid

- aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) // *Planta*. 2002. Vol. 214. N 6. P. 920–930.
63. Rinne P.L., Welling A., Vahala J., Ripel L., Ruonala R., Kangasjärvi J., van der Schoot C. Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1 3-β-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus* // *The Plant Cell*. 2011. Vol. 23. N 1. P. 130–146.
64. Wen L., Zhong W., Huo X., Zhuang W., Ni Z., Gao Z. Expression analysis of ABA- and GA-related genes during four stages of bud dormancy in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) // *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 2016. Vol. 91. N 4. P. 362–369.
65. Mølmann J.A., Asante D.K., Jensen J.B., Krane M.N., Ernsten A., Junttila O., Olsen J.E. Low night temperature and inhibition of gibberellin biosynthesis override phytochrome action and induce bud set and cold acclimation but not dormancy in PHYA overexpressors and wild-type of hybrid aspen // *Plant Cell Environ.* 2005. Vol. 28. N 12. P. 1579–1588.
66. Kumar G., Gupta K., Pathania S., Swarnkar M.K., Rattan U.K., Singh G., Sharma R.K., Singh A.K. Chilling affects phytohormone and post-embryonic development pathways during bud break and fruit set in apple (*Malus domestica* Borkh.) // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7: 42593.
67. Porto D.D., Bruneau M., Perini P., Anzanello R., Renou J.-P., Santos H.P.d., Fialho F.B., Revers L.F. Transcription profiling of the chilling requirement for bud break in apples: a putative role for FLC-like genes // *J. Exp. Bot.* 2015. Vol. 66. N 9. P. 2659–2672.
68. Кефели В.И., Коф Э.М., Власов П.В., Кислин Е.Н. Природный ингибитор роста-абсцизовая кислота. М.: Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, 1989. 184 с.
69. Rinne P.L., Kaikuranta P.M., Van Der Schoot C. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy // *Plant J.* 2001. Vol. 26. N 3. P. 249–264.
70. Busov V.B. Plant development: dual roles of poplar SVL in vegetative bud dormancy // *Curr. Biol.* 2019. Vol. 29. N 2. P. R68–R70.
71. Ruttink T., Arend M., Morreel K., Storme V., Rombauts S., Fromm J., Bhale Rao R.P., Boerjan W., Rohde A. A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar // *The Plant Cell*. 2007. Vol. 19. N 8. P. 2370–2390.
72. Oláh V., Hepp A., Mészáros I. Temporal dynamics in photosynthetic activity of *Spirodela polyrrhiza* turions during dormancy release and germination // *Environ. Exp. Bot.* 2017. Vol. 136. P. 50–58.
73. Ruonala R., Rinne P.L., Baghour M., Moritz T., Tuominen H., Kangasjärvi J. Transitions in the functioning of the shoot apical meristem in birch (*Betula pendula*) involve ethylene // *Plant J.* 2006. Vol. 46. N 4. P. 628–640.
74. Li M., Kim C. Chloroplast ROS and stress signaling // *Plant Commun.* 2022. Vol. 3. N 1: 100264.
75. Hüner N., Bode R., Dahal K., Busch F., Possmayer M., Szyszka B., Rosso D., Ensminger I., Krol M., Ivanov A., Maxwell D. Shedding some light on cold acclimation, cold adaptation, and phenotypic plasticity // *Botany*. 2012. Vol. 91. N 3. P. 127–136.
76. Hüner N., Dahal K., Hollis L., Bode R., Rosso D., Krol M., Ivanov A.G. Chloroplast redox imbalance governs phenotypic plasticity: the “grand design of photosynthesis” revisited // *Front. Plant Sci.* 2012. Vol. 3: 255.
77. Ensminger I., Busch F., Hüner N. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis // *Physiol. Plant.* 2006. Vol. 126. N 1. P. 28–44.
78. Öquist G., Hüner N.P. Photosynthesis of overwintering evergreen plants // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2003. Vol. 54. P. 329–355.
79. Sofronova V., Antal T., Dymova O., Golovko T. Seasonal changes in primary photosynthetic events during low temperature adaptation of *Pinus sylvestris* in Central Yakutia // *Russ. J. Plant Physiol.* Vol. 65. N 5. P. 658–666.
80. Lípová L., Krchňák P., Komenda J., Ilík P. Heat-induced disassembly and degradation of chlorophyll-containing protein complexes *in vivo* // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2010. Vol. 1797. N 1. P. 63–70.
81. Yang Q., Blanco N.E., Hermida-Carrera C., Lehotai N., Hurry V., Strand Å. Two dominant boreal conifers use contrasting mechanisms to reactivate photosynthesis in the spring // *Nat. Comm.* 2020. Vol. 11. N 1: 128.
82. Tikkanen M., Grebe S. Switching off photoprotection of photosystem I—a novel tool for gradual PSI photoinhibition // *Physiol. Plant.* 2018. Vol. 162. N 2. P. 156–161.
83. Vogg G., Heim R., Hansen J., Schäfer C., Beck E. Frost hardening and photosynthetic performance of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. I. Seasonal changes in the photosynthetic apparatus and its function // *Planta*. 1998. Vol. 204. N 2. P. 193–200.
84. Chang C.Y.Y., Bräutigam K., Hüner N.P., Ensminger I. Champions of winter survival: cold acclimation and molecular regulation of cold hardiness in evergreen conifers // *New Phytol.* 2021. Vol. 229. N 2. P. 675–691.
85. Valcke R. Can chlorophyll fluorescence imaging make the invisible visible? // *Photosynthetica*. 2021. Vol. 51. P. 381–398.
86. Vlaovic J., Balen J., Grgic K., Zagar D., Galic V., Simic D. An overview of chlorophyll fluorescence measurement process meters and methods // *Proceedings of 2020 International Conference on Smart Systems and Technologies (SST)* / Eds. D. Zagar, G. Martinovic, S. Rimac Drlje, and I. Galic. Computer Science and Information Technology Osijek, 2020. P. 245–250.
87. Hawkins C., Lister G. *In vivo* chlorophyll fluorescence as a possible indicator of the dormancy stage in Douglas-fir seedlings // *Can. J. Forest Res.* 1985. Vol. 15. N 4. P. 607–612.
88. Damesin C. Respiration and photosynthesis characteristics of current-year stems of *Fagus sylvatica*: from the seasonal pattern to an annual balance // *New Phytol.* 2003. Vol. 158. N 3. P. 465–475.
89. Lennartsson M., Ögren E. Predicting the cold hardiness of willow stems using visible and near-infrared spectra and sugar concentrations // *Trees*. 2003. Vol. 17. N 5. P. 463–470.
90. Linkosalo T., Heikkinen J., Pulkkinen P., Mäkipää R. Fluorescence measurements show stronger cold inhibition of photosynthetic light reactions in Scots pine compared to Norway spruce as well as during spring compared to autumn // *Front. Plant Sci.* 2014. Vol. 5: 264.
91. Sundblad L.-G., Sjöström M., Malmberg G., Öquist G. Prediction of frost hardiness in seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris*) using multivariate analysis of chlorophyll *a* fluorescence and luminescence kinetics // *Can. J. Forest Res.* 1990. Vol. 20. N 5. P. 592–597.
92. Sakar E.H., El Yamani M., Rharrabti Y. Frost susceptibility of five almond [*Prunus dulcis* (mill.) DA Webb]

cultivars grown in north-eastern Morocco as revealed by chlorophyll fluorescence // Int. J. Fruit Sci. 2017. Vol. 17. N 4. P. 415–422.

93. Savitch L.V., Leonardos E.D., Krol M., Jansson S., Grodzinski B., Huner N., Öquist G. Two different strategies for light utilization in photosynthesis in relation to growth and cold acclimation // Plant Cell Environ. 2002. Vol. 25. N 6. P. 761–771.

94. Corcuera L., Gil-Pelegrin E., Notivol E. Intraspecific variation in *Pinus pinaster* PSII photochemical efficiency in response to winter stress and freezing temperatures // PLoS One. 2011. Vol. 6. N 12: e28772.

95. Öquist G., Brunet L., Hällgren J.-E., Gezelius K., Hallén M., Malmberg G. Effects of artificial frost hardening and winter stress on net photosynthesis photosynthetic electron transport and RuBP carboxylase activity in seedlings of *Pinus sylvestris* // Physiol. Plant. 1980. Vol. 48. N 4. P. 526–531.

96. Grebe S., Trotta A., Bajwa A.A., Suorsa M., Gollan P.J., Jansson S., Tikkanen M., Aro E.M. The unique photosynthetic apparatus of Pinaceae—Analysis of

photosynthetic complexes in Norway spruce (*Picea abies*) // J. Exp. Bot. 2019. Vol. 70. N 12. P. 3211–3225.

97. Grebe S., Trotta A., Bajwa A., Mancinia I., Bag P., Jansson S., Tikkanen M., Aro E.M. Specific thylakoid protein phosphorylations are prerequisites for overwintering of Norway spruce (*Picea abies*) photosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2020. Vol. 117. N 30. P. 17499–17509.

98. Ivanov A., Sane P., Zeinalov Y., Simidjiev I., Huner N., Öquist G. Seasonal responses of photosynthetic electron transport in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) studied by thermoluminescence // Planta. 2002. Vol. 215. N 3. P. 457–465.

99. Zhang C., Atherton J., Penuelas J., Filella I., Kolari P., Aalto J., Ruhanen H., Back J., Porcar-Castell A. Do all chlorophyll fluorescence emission wavelengths capture the spring recovery of photosynthesis in boreal evergreen foliage? // Plant Cell Environ. Vol. 42. N 12. P. 3264–3279.

Поступила в редакцию 04.02.2022

После доработки 07.03.2022

Принята в печать 19.04.2022

REVIEW

Winter dormancy of woody plants and its non-invasive monitoring

A.E. Solovchenko^{1, 2, *} , E.N. Tkachyov³, E.M. Tsukanova³, B.M. Shuryhin¹, S.S. Khrushev⁴ , I.V. Konyukhov⁴, V.V. Ptushenko^{5, 6} 

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

²Institute of Natural Sciences, Derzhavin Tambov State University, 33 Internatsionalnaya str., Tambov, 392000, Russia;

³Michurin Federal Scientific Centre, 30 Michurina str., Michurinsk, 393760, Russia;

⁴Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

⁵Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–40 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

⁶Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina str., Moscow 119334, Russia

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

When dormant, perennial plants dwelling in the regions with pronounced seasonality of climate can withstand prolonged periods of harsh environmental conditions. The period of plant dormancy is commonly divided into pre-dormancy, endodormancy, and ecodormancy. During pre-dormancy, genetic, physiological, biochemical, and morphological rearrangements increasing stress resilience of the plant organism are completed. In the course of endodormancy, meristem cells cannot resume division even under favorable conditions. Environmental stimuli trigger dormancy release and the onset of ecodormancy when plant cell division and growth are restrained only by unfavorable environmental conditions. Frequent nowadays, weather fluctuations can lead to abnormal progression of dormancy. It results in the increased risk of damage to plants, especially crop plants, by adverse climatic conditions. This situation calls for the development of methods for noninvasive express monitoring of plant dormancy. Studies of the relationships between the dormancy status of plants and the functioning of their photosynthetic apparatus made possible the development of methods for monitoring of woody plant condition by recording the variable fluorescence of chlorophyll contained either in needles or in the endoderm of the shoots. This review briefly summarizes current knowledge about the mechanism of the dormancy induction and release. The functioning and regulation of the photosynthetic apparatus during winter dormancy as well as characteristic patterns of chlorophyll fluorescence induction in this period are considered. The difficulties of interpretation of chlorophyll fluorescence signals in the context of monitoring of plant dormancy are discussed together with its potential applications.

Keywords: *plant dormancy, endodormancy, ecodormancy, chlorophyll fluorescence, non-photochemical quenching, non-invasive monitoring*

Funding: The results were obtained using the resources of the Center for Collective Use of Scientific Equipment of Derzhavin Tambov State University. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the frame work of agreement № 075-15-2021-709 (unique project identifier RF – 2296.61321X0037).

Сведения об авторах

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 <https://orcid.org/0000-0001-6746-8511>

Ткачев Евгений Николаевич – канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр. ФНЦ имени И.В. Мичурина. Тел.: 8-47545-2-07-61; e-mail: etkachyov@yandex.ru

Цуканова Елена Михайловна – докт. с.-х. наук, вед. науч. сотр. ФНЦ имени И.В. Мичурина. Тел.: 8-47545-2-07-61; e-mail: elenam31@yandex.ru

Шурыгин Борис Михайлович – вед. инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: shu_b@mail.ru

Хрущев Сергей Сергеевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: sskhrsch@gmail.com; ORCID <https://orcid.org/0000-0002-4714-6221>

Конюхов Иван Владимирович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vanka.kon@gmail.com

Птушенко Василий Витальевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: ptush@mail.ru; ORCID <https://orcid.org/0000-0003-1268-4414>

ОБЗОР

УДК 577.25

Фотосенсорные и сигнальные свойства криптохромов

Г.Я. Фрайкин 

Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: gfraikin@yandex.ru

Белковые сенсоры синего света криптохромы составляют обширный класс фоторецепторов, которые регулируют процессы развития у растений и циркадные ритмы у животных и растений. Также эти фоторецепторы могут функционировать как магниторецепторы. В последнее время у нескольких фотосинтезирующих водорослей открыты и охарактеризованы криптохромы, которые могут действовать не только как регуляторные фоторецепторы, но и как фотолиазы, катализирующие репарацию повреждений ДНК ультрафиолетовым излучением. Все криптохромные белки связывают в качестве хромофора флавинадениндинуклеотид (ФАД) в гомологичном фотолизе домене (photolyase homology region, PNR). Кроме того, они содержат С-концевое удлинение (cryptochrome C-terminal extension, SSE), которое присоединено к PNR вблизи ФАД-связывающего сайта. Хромофор ответствен за фотосенсорные свойства криптохромов, а SSE-домен необходим для их сигнальной активности. Фотосенсорные процессы инициируются фотохимическими превращениями ФАД, включающими перенос электрона/протона и формирование редокс-форм. Эти реакции приводят к изменениям в хромофор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка составляют молекулярную основу сигнальной активности криптохромов в живых системах. У криптохромов растений белок с фотовосстановленным ФАД подвергается конформационному изменению, вызывающему разобщение PNR-домена и SSE, что сопровождается образованием функционально активных димеров/тетрамеров криптохромных молекул. Фотоолигомеризация рассматривается как ключевой процесс, необходимый для сигнальной активности криптохромов, поскольку олигомеры обеспечивают формирование их комплексов с разнообразными белками — компонентами сигнальных путей фоторецепторов. Взаимодействия «криптохром—белок» в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, что приводит к изменению экспрессии генов и фотоморфогенезу. В обзоре обсуждаются современные представления о фотосенсорных и сигнальных свойствах криптохромов.

Ключевые слова: криптохромы, фоторецепторы, ФАД-хромофор, редокс-формы, фотоактивация, сигнальные механизмы

Свет ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной областей электромагнитного спектра солнца (290–800 нм) — ключевой стимул окружающей среды, который воспринимается организмами всего биологического царства. Помимо его роли как основного источника энергии в фотосинтезе, свет несет жизненно важную информацию о пространстве и времени, способствуя организмам адаптироваться в условиях среды обитания. Широко распространенными видами физиологической адаптации к поглощению света являются поведенческие реакции, процессы развития и запуск циркадных ритмов.

Живые системы детектируют световые стимулы посредством сенсорных фоторецепторов, которые конвертируют физический сигнал в биохимические сигнальные каскады и последующие фотобиологические ответы. Сенсорные фоторе-

цепторные белки обычно содержат молекулы хромофоров, чувствительных к фотонам разной энергии. Поглощение фотона хромофором фоторецептора в адаптированном к темноте состоянии инициирует серию фотохимических реакций («фотоцикл»), которые связывают хромофор с окружающей белковой структурой. Возникающие изменения проявляются в переходе фоторецептора из «темнового» (неактивного) состояния в адаптированное к свету, или «сигнальное», конформационное состояние. Такой переход означает фотоактивацию фоторецептора. Обычно фотоцикл полностью обратим, т.е. метастабильное сигнальное состояние спонтанно распадается в термальной реакции в исходное темновое состояние. На основе конкретной природы и фотоцикла хромофора сенсорные фоторецепторы подразделяются на несколько различных классов. К ним

относятся фитохромы – сенсоры красного/дальнего красного света (600–750 нм), криптохромы и белки light-oxygen-voltage (LOV) – сенсоры ультрафиолетового света (УФ-света) в А-области (УФА)/синего света (320–400 нм/400–500 нм), а также белок UV resistance locus 8 (UVR8) – сенсор фотонов УФ-света в В-области (УФВ, 290–320 нм) [1]. За исключением белка UVR8, который не содержит специального хромофора, каждый фоторецептор может быть функционально разделен на фотосенсорный модуль, содержащий хромофор и обеспечивающий поглощение света, и эффекторный (сигнальный) модуль, опосредующий трансдукцию сигнала и физиологический ответ. В настоящем обзоре рассматриваются флавопротеиновые фоторецепторы криптохромы с флавинадениндинуклеотидом (ФАД) в качестве хромофора.

Свойства фотовозбужденных состояний флавиновых хромофоров

Известно, что фотофизические, фотохимические и спектроскопические свойства флавинов определяются системой сопряженных двойных связей их изоаллоксазинового кольца (рис. 1А). При поглощении фотона УФА/синего света происходит перераспределение заряда в изоаллоксазиновом кольце и изменение редокс-потенциала флавина, что инициирует его фотохимические превращения, вовлекающие перенос электрона/протона

и образование радикальных форм. Результаты теоретического изучения изоаллоксазинового кольца свидетельствуют, что как первое синглетное (S_1), так и триплетное (T_1) возбужденные состояния флавинов соответствуют π – π^* -переходам. Однако свойства этих состояний ФАД и флавинмононуклеотида (ФМН), служащего хромофором у LOV-фоторецепторов, различаются. У ФМН T_1 -состояние формируется с высоким квантовым выходом ($\phi = 0,5$ – $0,7$). При этом эффективное заселение T_1 -уровня ФМН, ответственное за фотохимическую активность этого хромофора, определяется исключительно внутренним свойством изоаллоксазинового кольца. Хромофор криптохромов ФАД отличается от ФМН тем, что на проявление свойств фотовозбужденного изоаллоксазина влияет пространственная близость второго гетероцикла – аденина. Создаваемое ими стэкинг-расположение (стопочная U-образная конфигурация) обуславливает фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос электрона, приводящий к тушению S_1 -состояния, снижению интенсивности флуоресценции с максимумом при 520–530 нм и значительному ослаблению формирования T_1 -состояния ФАД [2].

У криптохромов растений ФАД может существовать в четырех формах: полностью окисленной (ФАД), анион-радикальной (ФАД $^{\cdot-}$), нейтральной радикальной (ФАДН $^{\cdot}$) и анион-восстановленной (ФАДН $^-$). Восстановление фото-

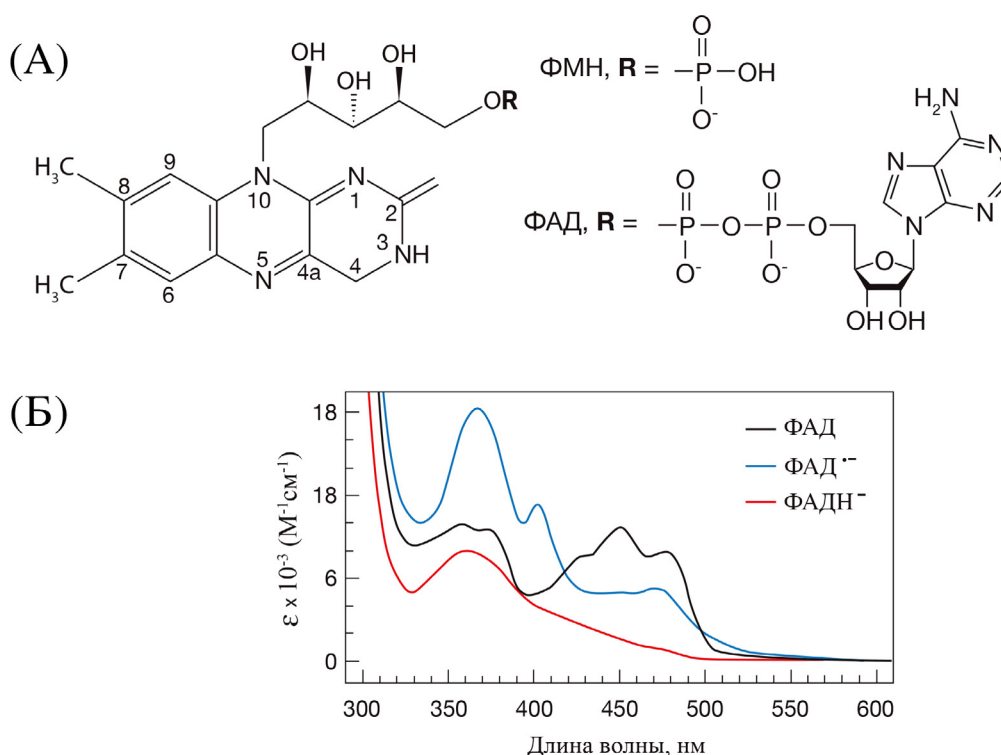


Рис. 1. Изоаллоксазиновое кольцо флавинов (А) определяет их спектроскопические свойства; фотофизические и фотохимические свойства у ФАД и ФМН отличаются. Абсорбционные спектры трех редокс-форм ФАД криптохрома (Б). У окисленной формы ФАД и анион-радикала ФАД $^{\cdot-}$ максимумы в видимой области расположены при 450 нм и при 410 и 470 нм соответственно, у анион-восстановленной формы ФАДН $^-$ максимум в видимой области отсутствует. У формы ФАДН $^{\cdot}$ максимумы поглощения расположены в области 500–650 нм.

возбужденного флавина (ФАД*) включает следующие реакции: $\text{ФАД}^* + e^- \rightarrow \text{ФАД}^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{ФАДН}^{\cdot-} + e^- \rightarrow \text{ФАДН}^-$ [3]. Молекулярная орбиталь, вовлекаемая в переход $\text{ФАД} \rightarrow \text{ФАДН}^-$ после последовательного присоединения второго электрона, является антисвязывающей между $\text{N}_5\text{—C}_{4a}$ и связывающей между $\text{C}_{4a}\text{—C}_{10a}$. Это трансформирует связи $\text{N}_5=\text{C}_{4a}\text{—C}_{10a}=\text{N}_1$ у полностью окисленной формы флавина в связи $\text{N}_5\text{—C}_{4a}=\text{C}_{10a}\text{—N}_1$ у анион-восстановленной формы (ФАДН⁻) [3]. Согласно теоретически рассчитанным абсорбционным электронным спектрам с колебательно разрешенной структурой, у всех редокс-форм ФАД энергетически наинизший максимум представлен одним электронным переходом типа $\pi\text{—}\pi^*$, сосредоточенным в центре изоаллоксазинового кольца. Анализ этих спектров показывает, что в целом они согласуются с экспериментальными абсорбционными спектрами ФАД (рис. 1Б). Все редокс-формы ФАД имеют в спектрах поглощения максимум в области УФА при 360–370 нм. У анион-восстановленной формы (ФАДН⁻) максимум в этой области единственный (видимый свет ФАДН⁻ поглощает очень слабо). У полностью окисленной формы ФАД максимум в видимой области спектра расположен при 450 нм, анион-радикал ФАД^{·-} имеет максимумы при 410 нм и 470 нм. У ФАДН^{·-} максимумы сильно сдвинуты из синей области в зеленую и красную области спектра между 500 и 650 нм; это принципиальное отличие нейтрального радикала от ФАД и ФАД^{·-} [4]. Приведенные данные показывают, что каждая редокс-форма ФАД характеризуется специфическими максимумами в спектрах поглощения. Поэтому абсорбционные спектры в области УФА и видимой области предоставляют важную информацию о редокс-состояниях хромофора ФАД в фоторецепторных белках.

Как отмечено выше, при поглощении фотона хромофор ФАД криптохромов подвергается редокс-реакциям. Эти реакции инициируют фотосенсорный процесс, который включает изменения в хромофор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка, непосредственно окружающего хромофор, распространяются внутри фоторецепторов, что составляет молекулярную основу их сигнальной активности в живых системах. В течение нескольких последних лет опубликовано много работ с новой более детальной информацией о первичных механизмах фотосенсорных и сигнальных процессов, опосредуемых криптохромами у разных организмов. На анализе данных, содержащихся в этих работах, сосредоточено основное внимание в настоящем обзоре.

Белки семейства криптохромы/фотолиазы: общие сведения

Первыми были идентифицированы криптохромы (cryptochromes: CRY1/CRY2) из растения *Arabidopsis thaliana*. Позднее гены родственных им белков были найдены в геномах многих организмов из разных филогенетических групп — бактерий, водорослей, грибов и животных [2, 5–7]. Все криптохромные белки объединяет значительное структурное сходство с фотолиазами. Эти светочувствительные ферменты содержат кофактор ФАД в форме ФАДН⁻. В фотовозбужденном состоянии ФАДН⁻ непосредственно участвует в репарации двух главных УФ-индуцированных повреждений ДНК — циклобутановых пиримидиновых димеров (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) или пиримидин (6-4) пиримидиновых фотопродуктов (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts, 6-4PP) (рис. 2). Ферменты, репарирующие CPD или 6-4PP, названы соответственно

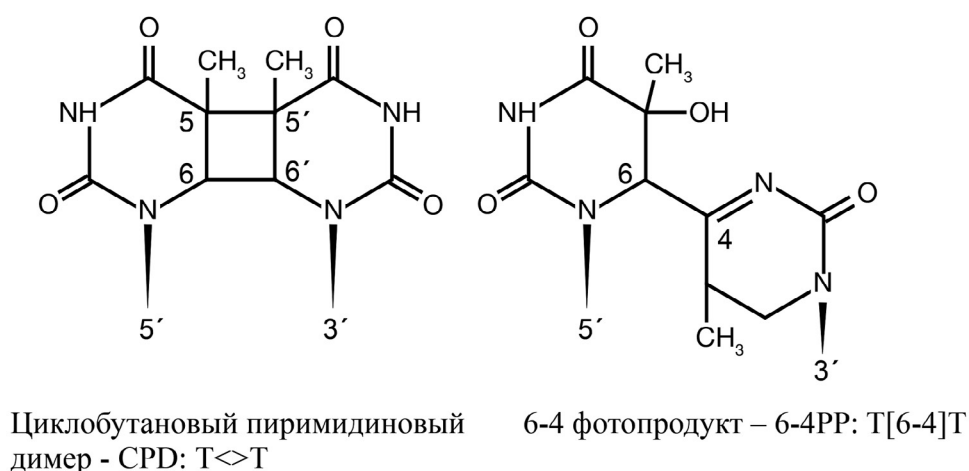


Рис. 2. Основные типы индуцированных УФ-излучением повреждений ДНК на примере оснований тимина (Т), расположенных в одной цепи ДНК. В CPD два соседних основания ковалентно связаны, образуя цикlobутановое кольцо; у 6-4PP формируется сложная химическая структура, где атомы кислорода и водорода в одном основании переносятся к другому основанию, а затем между ними образуется одинарная ковалентная связь. Этим объясняется значительно более низкий квантовый выход фоторепарации ДНК (6-4)-фототиазы по сравнению с квантовым выходом фоторепарации CPD-фототиазы.

CPD-фотолиазами или (6-4)-фотолиазами [8]. Несмотря на сходство структур двух типов фотолиз и первичной фотохимии их кофактора ФАД, квантовый выход фоторепарации (6-4)-фотолиазами ($\phi = 0,1$) значительно меньше квантового выхода фоторепарации CPD-фотолиазами ($\phi = 0,7-0,9$). Это обусловлено тем, что фоторепарация 6-4PP по сравнению с фоторепарацией CPD более сложная реакция. Подробнее этот вопрос рассматривается в следующем разделе.

Принято считать, что криптохромы эволюционировали от фотолиазного предшественника, причем разделение генов криптохромов и фотолиаз произошло до дивергенции прокариот и эукариот. В пользу этого свидетельствуют данные о наличии генов как фотолиз, так и криптохромов в бактериальных геномах. Подтверждением общих эволюционных корней фотолиз и криптохромов может служить открытие у грибов, диатомей и зеленых водорослей белков с двойной функцией – фотолиазной и регуляторной [9–11].

Криптохромы, как и фотолиазы, содержат в качестве основного хромофора ФАД, но, в отличие от его каталитической функции у фотолиз, у криптохромов ФАД определяет главным образом их фотосенсорные и сигнальные свойства. Большинство криптохромов не способны катализировать фоторепарацию ДНК. Однако отдельные их представители, относящиеся к семейству криптохромов/фотолиз (cryptochrome/photolyase family, CPF), сохраняют эту способность. Согласно современной филогенетической и функциональной классификации [7, 9], белки CPF подразделяются на четыре класса. Среди них отметим два основных: растительные криптохромы и подобные им белки (plant-like, pCRY) и криптохромы животных и схожие с ними белки (animal-like, aCRY). Криптохромы растений и зеленых водорослей (например, CPN1 *Chlamydomonas reinhardtii*) действуют в основном как сенсорные фоторецепторы, тогда как криптохромы животных могут выполнять функции либо фоторецепторов (тип I), либо не реагирующих на свет регуляторов циркадных ритмов (тип II). Криптохромы типа I найдены у насекомых (их прототипом считается криптохром *Drosophila melanogaster*, dCRY), а криптохромы типа II – у млекопитающих. Недавно у птиц, рыб, земноводных и пресмыкающихся выявлен еще один тип криптохромов, которые содержат ФАД и обладают фотохимической активностью [12].

Кроме того, открыты и охарактеризованы подобные животным криптохромы вне царства животных – главным образом, у фотосинтезирующих водорослей, где они могут действовать не только как сигнальные фоторецепторы, но и как (6-4)-фотолиазы [10, 11]. Зеленая водоросль *C. reinhardtii* содержит помимо белка pCRY (CPN1) белок aCRY (CraCRY), который на 40–50% гомо-

логичен по последовательности белкам aCRY из зеленой водоросли *Ostreococcus tauri* (OtCPF1) и диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* (PtCPF1), а также (6-4)-фотолиазе из зеленой водоросли *Dunaliella salina*. Криптохромы PtCPF1, OtCPF1 и CraCRY являются бифункциональными белками, проявляющими (6-4)-фотолиазную активность и функцию регуляторов экспрессии генов. Интересно, что регуляторная функция белка CraCRY выявлена не только при действии синего света, поглощаемого хромофором ФАД в окисленной форме, но и при действии красного света, поглощаемого ФАДН⁺ [11].

Почти все белки CPF подвергаются светоиндуцированной реакции, называемой фотоактивацией, в которой каталитически неактивный ФАД при фотовозбуждении отрывает электрон от соседнего триптофана. В восстановленном состоянии флавиновый хромофор либо инициирует трансдукцию сигнала (ФАДН⁺), либо после дальнейшего поглощения фотона катализирует репарацию ДНК (ФАДН⁻). Быстрый перенос электрона с поверхности белка на ФАД обеспечивается триадой триптофанов. Этот внутримолекулярный путь переноса электрона удлиняется у CraCRY и криптохромов животных типа I за счет четвертого ароматического остатка [13, 14] – тирозина (CraCRY) или триптофана (dCRY). Удлиненный электрон-транспортный путь необходим не только для реакций фотовосстановления ФАД у белков aCRY, но также для функционирования (6-4)-фотолиз.

Все криптохромы определяются по их схожей двухдоменной структурной организации, включающей N-концевой α/β -домен, который содержит β -лист, и C-концевой α -спиральный домен, связывающий хромофор ФАД. Вместе они составляют высококонсервативную гомологичную фотолиазе область (photolyase homology region, PHR), называемую также PHR-доменом. Кроме того, в структуру криптохромов входит различающееся по числу аминокислотных остатков C-концевое удлинение (CRY C-terminal extension, CCE), называемое также CCE-доменом [15]. У CRY1 и CRY2 CCE-домен состоит из 180 и 110 остатков соответственно. В темноте CCE-домен сильно связан PHR-доменом, но после фотоактивации высвобождается из ядра PHR и переходит в неупорядоченное состояние. Деструктурированная часть CCE из 80 остатков становится затем доступной для взаимодействия с некоторыми белками – компонентами сигнальных путей криптохромов. У фотолиз CCE-домен отсутствует, а у криптохромов играет роль эффекторного домена. Ранее считалось, что PHR криптохромов растений действует только как фотосенсорный домен. Однако полученные недавно данные о физическом взаимодействии большинства известных в настоящее время сигнальных белков с PHR-доменом крип-

тохромов позволяют считать, что PNR, как и CSE, тоже может выполнять функцию эффекторного домена [16].

Впервые определенная кристаллическая структура PNR-домена CRY1 проявляет удивительное сходство со структурой CPD-фотолиазы *Escherichia coli*, несмотря на их эволюционную отдаленность. Однако кристаллическая структура растительного криптохрома полной длины из-за технической трудности кристаллизации белка с большим внутренне неупорядоченным CSE-доменом пока не получена. У криптохрома дрозофилы dCRY, содержащего сравнительно малый CSE-домен, удалось определить не только кристаллическую структуру полной длины, но и его комплексов с соответствующими сигнальными белками. Результаты этого исследования демонстрируют центральную роль ФАД-связывающего кармана и физических взаимодействий между PNR- и CSE-доменами в функционировании криптохромов животных [17]. Существует общее согласие в том, что и у криптохромов растений светозависимые изменения во взаимодействии между PNR- и CSE-доменами могут объяснить фотоиндуцированные конформационные переходы. Однако конкретные сайты взаимодействия между PNR и CSE еще предстоит идентифицировать.

По современным представлениям, фотоактивация криптохромов растений начинается с поглощения фотона синего света хромофором ФАД и его фотовосстановления. Это приводит к конформационным изменениям, вызывающим разобщение PNR- и CSE-доменов и последующий переход фоторецептора из конформации с закрытым CSE-доменом в конформацию с открытым CSE-доменом. Такие изменения сопровождаются формированием гомодимеров и гомотетрамеров криптохромов, которые необходимы для образования их комплексов с различными сигнальными белками. Взаимодействия в таких комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая тем самым регуляцию ими экспрессии генов и программ развития растений. При изучении перечисленных процессов в последние годы получены новые результаты, которые рассматриваются ниже.

Фотохимические процессы в белках CPF и фотоактивация криптохромов

Структурное сходство между PNR-доменом криптохромов и фотолиазами, особенно в белковом кармане, связывающем флавин, определяет общий принцип их реагирования на свет: у обоих типов белков фотоиндуцированное возбуждение хромофора инициирует реакции переноса электрона. Однако механизмы фотохимических процессов у криптохромов и фотолиаз фундаментально различаются. Это, в частности, выражается в редокс-формах хромофора ФАД в ходе его фото-

циклов. Активация светом фотолиаз происходит с участием двух хромофоров: каталитического ФАД, существующего в основном состоянии в анион-восстановленной форме (ФАДН⁻), а также антенного хромофора. У большинства фотолиаз функцию антенного хромофора выполняют 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate, MTHF) или 8-гидроксидезафлавин (8-hydroxydeazaflavin, 8-HDF). Указанные хромофоры имеют более высокие коэффициенты молярного поглощения в области УФА ($\epsilon_{370\text{nm}} = 29000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ у MTHF или $\epsilon_{400\text{nm}} = 25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ у 8-HDF) по сравнению с ФАДН⁻ ($\epsilon_{370\text{nm}} = 8000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ или $\epsilon_{400\text{nm}} = 2800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Это увеличивает количество поглощенных фотонов, используемых для фотофизического резонансного переноса энергии возбуждения к ФАДН⁻, повышая его потенциал восстанавливать CPD или 6-4PP для последующей их репарации. Кроме того, может значительно возрастать скорость репарации ДНК, что важно в условиях слабой освещенности. При связывании фотолиазы с участком ДНК, содержащим CPD или 6-4PP, образуется стабильный комплекс, в котором эти фотопродукты оказываются в тесном (в пределах действия ван-дер-ваальсовых сил) контакте с ФАДН⁻. В каталитическом акте происходит перенос электрона от ФАДН⁻ в синглетно-возбужденном состоянии к повреждению ДНК, что приводит к образованию комплекса с переносом заряда между нейтральным радикалом флавина (ФАДН[•]) и анион-радикалом CPD или 6-4PP. Далее в анион-радикале CPD происходят перераспределение электронной плотности и расщепление циклобутанового кольца на два исходных пиримидина, а ФАДН[•] восстанавливается обратным переносом избыточного электрона в активную форму ФАДН⁻, участвующую в последующих фотокаталитических циклах.

В анион-радикале 6-4PP С6 5'-основания соединены с С4 3'-основания; при этом ОН-группа при С4 3'-основания перемещена к С5 5'-основания (рис. 2). В отличие от CPD, в котором разрыв 5–6-связей восстанавливает основания в их исходные формы, в анион-радикале 6-4PP разрыв связей С6–С4 и С5–ОН приводил бы к формированию двух поврежденных оснований, т.е. репарации ДНК не происходило бы. Поэтому для репарации 6-4PP фермент должен катализировать не только реакции разрыва связей, но и реакцию переноса ОН-группы. Однако, поскольку интермедиат в форме анион-радикала 6-4PP не может подвергаться этим двум согласованным реакциям, была предложена модель, согласно которой формирование неповрежденных пиримидинов (после разрыва связей С4–С6 и С5–ОН) возможно при условии превращения анион-радикала в другой интермедиат — оксетан. Недавно этот механизм подтвержден данными кристаллографического

анализа структуры комплекса PHR CraCRY с фрагментом ДНК, содержащим 6-4PP [18]. Из анализа следует, что в формировании интермедиата оксетана ключевую роль играют два остатка гистидина в активном сайте, которые вовлекаются в перенос протонов. В соответствии с полученными результатами механизм репарации ДНК (6-4)-фотолиазой предполагает поглощение второго фотона для перехода от интермедиата оксетана к разрыву связей C4–C6 и C5–ОН. Эта вторая стадия аналогична однофотонной репарации димеров пиримидинов CPD-фотолиазами.

Помимо циклического переноса электрона от фотовозбужденного ФАДН⁻, в процессе которого происходит репарация повреждений ДНК, у фотолиаз существует второй путь переноса электрона. Он вовлекает три или четыре консервативных остатка триптофана. Этот путь, называемый фотохимической активацией, не требуется для репарации ДНК, но, как полагают, важен для поддержания заселенности возбужденного состояния ФАДН⁻ [9].

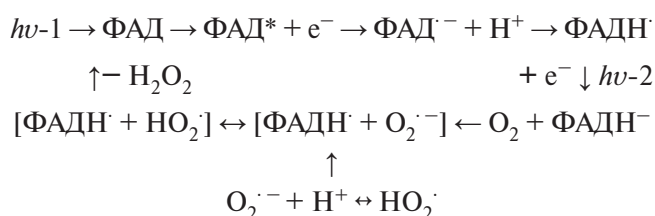
Большинство данных по фотохимии криптохромов получено при изучении CRY1/CRY2 *A. thaliana*, CPN1 и CraCRY *C. reinhardtii* и dCRY *D. melanogaster* [14, 19–22]. В отличие от фотолиаз, эти криптохромы в основном состоянии содержат ФАД в полностью окисленной форме и обычно (за исключением CraCRY, который дополнительно встраивает хромофор 8-HDF) не связывают антенный хромофор. Как показывают структуры криптохромов, это обусловлено замещением ключевых аминокислотных остатков в белковых карманах, связывающих антенный хромофор, что препятствует его узнаванию и встраиванию.

При исследовании CRY1 и CPN1 с применением инфракрасной Фурье-спектроскопии в сочетании со спектроскопией временного разрешения в ультрафиолетовой и видимой области установлено, что при поглощении синего света ФАД в синглетном возбужденном состоянии восстанавливается в анион-радикал ФАД⁻ посредством переноса электрона от соседнего остатка триптофана (Три₁Н) – компонента консервативной триады триптофанов. Эта сверхбыстрая реакция переноса электрона к ФАД происходит за 0,4 фс [23], а реакции переноса электрона между концевым триптофаном (Три₃Н) и Три₁Н происходят за 31 пс. Они сопровождаются формированием катион-радикала концевой триптофана (Три₃Н⁺), который после депротонирования переходит в радикал Три₃[•]. Последующее взаимодействие Три₃[•] с остатком тирозина (ТирОН) вызывает его восстановление до Три₃Н и образование радикала тирозина (ТирО[•]) в течение нескольких мс.

Образующийся при фотовосстановлении ФАД анион-радикал (ФАД⁻) протонируется у CRY1 и CPN1 в течение нескольких микросекунд и переходит в нейтральный радикал (ФАДН[•]). Согласно

полученным данным, донором протона в этой реакции может служить близко расположенный к изоаллоксазиновому кольцу флавина остаток аспарагиновой кислоты. Очевидно, что исчезновение радикала ФАД⁻ отделено от процессов внутри триады триптофанов, поскольку его протонирование и переход в форму ФАДН[•] задержано во времени на 6–7 порядков по отношению к изначальному переносу электрона. Такое отчетливое разделение двух процессов представляется удивительным, если учесть, что донор протона находится в непосредственной близости к флавину. Объяснение этого противоречия может состоять в том, что для переноса протона аспарагиновой кислоте требуется предварительная структурная реорганизация, так как она формирует водородную связь с атомом кислорода белковой структуры [23]. Интересно, что остаток аспарагиновой кислоты сохранен только у криптохромов растений, тогда как у криптохромов животных типа 1, например, у dCRY, он замещен остатком цистеина. Вероятно, этим объясняется отсутствие сопряженного с переносом электрона протонирования при фотовосстановлении ФАД у dCRY и образование только анион-радикала ФАД⁻. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, согласно которым замена аспарагиновой кислоты на цистеин в PHR-домене CPN1 полностью блокирует перенос протона. Реакция протонирования функционально значима для криптохромов растений, поскольку время жизни ФАДН[•] возрастает до нескольких миллисекунд *in vitro* и нескольких минут *in vivo* [20, 24].

Как отмечено выше, в отличие от всех других редокс-форм флавина, имеющих поглощение только в синей/УФА-области, ФАДН[•] поглощает в зеленой и красной области (500–650 нм). Это свойство ФАДН[•] способствовало подтверждению его роли как сигнальной формы флавинового хромофора у криптохромов растений. Было показано, что добавление зеленого света подавляет ряд контролируемых криптохромом ответов на синий свет. Антагонистическое действие зеленого света коррелировало с уменьшением концентрации ФАДН[•] в результате его фотовосстановления в неактивную форму ФАДН⁻. Фотохимические превращения флавинового хромофора завершаются реакцией ФАДН[•] с кислородом и регенерацией исходного окисленного состояния ФАД [19]. В совокупности редокс фотоцикл ФАД-хромофора криптохромов растений можно представить в виде следующей упрощенной схемы:



При поглощении фотона синего света в области 400–500 нм ($h\nu-1$) ФАД переходит в фотовозбужденное состояние ФАД* и на него переносится электрон от остатка триптофана, включенного в триаду триптофанов. Образующийся катион-радикал ФАД^{•+} протонируется до нейтрального радикала ФАДН[•]. После поглощения нейтральным радикалом фотона длинноволнового видимого света в области 500–650 нм ($h\nu-2$) и переноса на него электрона формируется восстановленный анион ФАДН^{•-}. Цикл завершается окислением этой формы флавина молекулярным кислородом в исходную форму ФАД. На первой стадии окисления интермедиатом может быть радикальная пара [ФАДН[•] + O₂^{•-}]. На второй стадии в радикальной паре супероксид O₂^{•-} заменен на свою протонированную форму HO₂[•], с которой он находится в равновесии и которая окисляет ФАДН[•] в ФАД с выходом H₂O₂ [25].

Как уже было отмечено, сигнальная активность криптохромов обеспечивается их ССЕ-доменом, тогда как PNR-домен осуществляет регулируемый светом контроль над функцией ССЕ. После фотоактивации ССЕ-домен высвобождается и может взаимодействовать с компонентами сигнальных путей криптохрома. Однако до недавнего времени вопрос о том, как высвобождение ССЕ связано с фотохимией криптохрома, оставался невыясненным.

В исследовании с применением инфракрасной спектроскопии временного разрешения обнаружено, что после формирования сигнальной формы ФАДН[•] в N-концевом α/β - субдомene PNR фоторецептора CPN1 в течение 500 мкс происходит заметное изменение структуры β -листа. Этот факт рассматривается как свидетельство ключевой роли β -листа во взаимодействии PNR и ССЕ, а также роли его деструктуризации в сигнальном процессе [23]. Интересно, что у CRY1 переход ССЕ в неупорядоченное состояние происходит за время 100 мс после формирования ФАДН[•], т.е. намного позже. В предложенной на основе этих данных модели [23] показано, как структурные изменения согласуются во времени с фотохимией флавинового хромофора у криптохромов растений.

Структурные аспекты трансдукции сигнала криптохромами: фотоолигомеризация и взаимодействие с сигнальными белками

Как следует из рассмотренных выше данных, криптохромы с фотовосстановленным ФАД подвергаются конформационным изменениям, приводящим к разобщению PNR- и ССЕ-доменов. В последнее время показано, что этот процесс может вызывать изменения во взаимодействии между молекулами криптохромов, сопровождаемые их гомеолигомеризацией. Фотоолигомеризация требуется для физиологической активности криптохромов растений, так как обеспечивает повышение

их сродства к сигнальным белкам, таким как транскрипционные факторы CRY-interacting basic helix-loop-helix – bHLHs (CIBs), комплекс репрессоров фотоморфогенеза constitutive photomorphogenic1 (COP1)/ suppressors of phytochrome A (SPAs) и ингибиторы криптохромов blue-light inhibitors of CRYs (BICs). В результате взаимодействия в комплексе гомеолигомера криптохрома с этими белками изменяется их сигнальная активность, что приводит к изменению экспрессии генов и регуляции программ развития растений [26]. Следует отметить, что ключевые детали этой модели не были точно определены. Особенно это касается структурных изменений в гомодимере криптохрома, на основании которых можно было бы его отличить от структуры мономера.

Для решения этого вопроса проведено генетическое изучение связи структуры и функции у криптохромов растений [27, 28]. Показано, что мутации остатков триптофана Три-триады (Trp triad) у CRY1 или CRY2 блокируют каскад переноса электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, но не влияют на физиологическую активность мутантов *in vivo*. Некоторые мутанты, а именно, Три374Ала у CRY2 или его эквивалент Три377Ала у CRY1, проявляют конститутивную, т.е. независимую от света, физиологическую активность. Используя преимущество таких мутантов, недавно определили структуры активных гомеолигомеров криптохромов. В отличие от дикого типа CRY2, который подвергается фотоолигомеризации, мутант Три374Ала CRY2 проявляет гомеолигомеризацию *in vitro*. Этот результат согласуется с данными о том, что фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRY2 и что мутант Три374Ала CRY2 конститутивно активен *in vivo* [26].

Методом низкотемпературной электронной микроскопии с визуализацией выявлены конфигурации гомодимера и гомотетрамера мутанта Три374Ала CRY2, у которого эти олигомеры формируются посредством взаимодействий поверхностей PNR-доменов. Мутации в интерфейсе CRY2 приводили к уменьшению сродства гомодимера к сигнальному белку CIB1. На основании этого факта предположили, что CIB1 взаимодействует с CRY2 в интерфейсе гомодимера, и, вероятно, поэтому именно олигомеры, а не мономеры являются активными формами криптохромов [29]. Следует отметить, что большинство остатков, находящихся в одном из двух интерфейсов CRY-тетрамера, являются консервативными у криптохромов растений, но не у криптохромов животных. В этой связи было бы интересно определить, требуется ли гомеолигомеризация для функционирования данной группы криптохромов, которые могли развить иные структуры интерфейсов, или зависимый от димеризации механизм фотоактивации криптохромов растений уникален.

Известно, что фотоактивированные криптохромы растений могут подвергаться инактивации по трем механизмам, включая спонтанную темновую реверсию гомоолигомеров в мономеры, взаимодействие с ингибиторами (BICs) и убиквитин-зависимый протеолиз. Среди этих механизмов только ингибирование криптохромов, вызываемое BICs, является светочувствительным процессом. Это предполагает, что взаимодействие CRY–BIC может играть более динамичную роль в регуляции активности криптохромов у растений, растущих на свету. Недавно проведенный анализ кристаллической структуры комплекса PHR–CRY2 с BIC2 выявил два возможных механизма, проясняющих вопрос о том, как белки BIC могут инактивировать криптохромы растений [30]. Во-первых, BIC может ингибировать фотовосстановление ФАД. Порядка десяти остатков CRY2 находятся в непосредственной близости от ФАД. Связывание BIC2 с PHR–CRY2 увеличивает расстояние между донором электрона (Три397) и акцептором (изоаллоксазиновое кольцо ФАД), что может затруднить перенос электрона. Кроме того, такое связывание может привести к вращению карбоксильной боковой цепи предполагаемого донора протона (Асп393) на 50°, что увеличит расстояние между донором протона и акцептором протона в хромофоре. Такое изменение делает протонирование практически невозможным. Соответственно, BIC2 может блокировать фотовосстановление ФАД в ФАД[–] и его протонирование в ФАДH⁺. Во-вторых, BICs могут действовать как конкурентные ингибиторы гомоолигомеризации CRY2. В комплексе PHR–CRY2 с BIC2 структура фрагмента BIC2 определяет его способность опоясывать паз между двумя субдоменами PHR-домена CRY2. PHR–CRY2 и BIC2 имеют по 16 остатков, которые вовлекаются в формирование комплекса между ними. Индивидуальные мутации нескольких остатков в интерфейсе комплекса снижали выраженное сродство между PHR–CRY2 и BIC2 *in vitro*. Интерфейсы гетеродимера CRY–BIC и гомодимера CRY–CRY содержат два остатка CRY2 – Три349 и аргинин (Арг208). В гетеродимере остаток Три349 гидрофобно взаимодействует с изолейцином (Иле57) BIC2, тогда как Арг208 формирует солевой мостик и водородную связь с глутамином (Глу50) BIC2. В гомодимере CRY2–CRY2 Три349 и Арг208 находятся в интерфейсе. Эти данные убеждают, что связывание BICs с CRYs конкурентно ингибирует фотоолигомеризацию CRY, блокируя тем самым его фотоактивацию.

В заключение можно констатировать, что понимание первичных механизмов восприятия света криптохромами и принципов их функционирования у разных организмов значительно улучшилось за последние несколько лет. Особого внимания заслуживают результаты исследования крипто-

хромных фоторецепторов, выявленных недавно у зеленой водоросли *C. reinhardtii* (CPH1, CraCRY) и у позвоночных животных (CRY4). Эти фоторецепторы охарактеризованы в отношении структуры и разнообразных функций; у них детально изучены фотоциклы флавиновых хромофоров, которые отличаются из-за природы и числа ароматических остатков и других аминокислот, участвующих в каскаде переноса электрона/протона при фотовосстановлении флавина [11, 31]. У криптохромов растений поглощение света хромофором инициирует перенос электрона к флавину через триаду триптофанов. У криптохромов животных типа I и подобных криптохромам животных (aCRY) этот электронно-транспортный путь включает четвертый ароматический остаток, который может быть либо триптофаном (dCRY), либо тирозином (CraCRY). У криптохрома голубя *Columba livia* (ClCRY4) цепь из Три-триады удлиняется за счет четвертого триптофана и остатка тирозина. Этим определяется наиболее высокий квантовый выход фотовосстановления флавинового хромофора у ClCRY4 по сравнению с другими криптохромами.

Несмотря на то, что механизм фотовосстановления ФАД детально изучен *in vitro*, вопрос о том, как конкретно перенос электрона к ФАД вовлекается в фотоактивацию криптохромов, остается нерешенным. Показано, что мутации остатков Три-триады у CRY1/CRY2, которые блокируют перенос электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, не влияют на их биохимическую и физиологическую активность *in vivo* [27, 28]. Иными словами, зависимое от Три-триады фотовосстановление ФАД не требуется для функционирования криптохромов. Очевидно, для раскрытия механизма фотоактивации криптохромных белков необходимо дальнейшее исследование альтернативного пути переноса электрона с применением новых и инновационных подходов. Другой вопрос, связанный с фотоциклом ФАД, относится к магниточувствительной функции криптохромов.

Радикальные пары в фотоцикле ФАД и магниточувствительность криптохромов

Принято считать, что в основе магниточувствительности криптохромных белков лежит формирование радикальных пар, на которые могут влиять слабые магнитные поля [32]. Следствием этого может быть изменение химических констант скоростей редокс-реакций ФАД, создающее отличие в концентрации активированного состояния фоторецептора и, соответственно, измененную биологическую активность. Однако природа магниточувствительных радикальных пар и стадии, на которых они действуют в течение редокс-цикла криптохромов, пока точно не определены и являются предметом дискуссий. На основании боль-

шого числа экспериментальных и теоретических работ предложены две альтернативные модели формирования разных радикальных пар, определяющих магниточувствительность криптохромов. Согласно модели 1, радикальная пара [ФАД⁻ Три⁺] образуется путем иницирующей реакции переноса электрона к фотовозбужденному ФАД от остатка триптофана, включенного в триаду (тетраду) триптофанов. Эта радикальная пара подвергается магниточувствительной интерконверсии между синглетным и триплетным состояниями: $^1[\text{ФАД}^{\cdot-} \text{Три}^{\cdot+}] \leftrightarrow ^3[\text{ФАД}^{\cdot-} \text{Три}^{\cdot+}]$. При протонировании ФАД⁻ может переходить в форму ФАДН⁻ и после фотовосстановления — в неактивную форму ФАДН⁻.

Темновое реокисление ФАДН⁻ в реакции с кислородом принято за основу в модели 2, предполагающей, что интермедиатом в этом процессе может быть радикальная пара [ФАДН⁻ О₂⁻]. Она также может подвергаться магниточувствительному взаимопревращению между синглетным и триплетным состояниями; при этом синглетное состояние переходит в исходную форму ФАД после высвобождения перекиси водорода, как показано на приведенной выше схеме редокс-фотоцикла ФАД-хромофора. В недавнем исследовании получено частичное подтверждение такого механизма [33]. Показано, что ответы CRY1 на свет *in vivo* усиливаются в магнитном поле, причем даже в случае его воздействия во время темновых интервалов между освещением. Поэтому считается, что магниточувствительная реакция в фотоцикле криптохрома происходит на стадии реокисления ФАДН⁻ и может вовлекать активные формы кислорода. Однако их конкретная природа пока не определена. Кроме того, в соответствии с данными теоретического анализа, радикальная пара флавин/супероксид кислорода вряд ли может быть магниточувствительным интермедиатом у криптохромов из-за очень быстрой релаксации спина супероксида. Очевидно, для идентификации магниточувствительных интермедиатов требуются дальнейшие исследования.

Главный проблемный вопрос, касающийся отмеченной выше модели 1, состоит в том, что она включает некоторые результаты, являющиеся спорными из-за существования противоречий

между фотохимическими и биологическими данными. Кроме того, в ряде работ по ориентации птиц в магнитном поле получены данные, которые не согласуются с обсуждаемой моделью. В одной из них продемонстрировано, что птицы могут ориентироваться в магнитном поле при действии зеленого света, фотоны которого ФАД не поглощает, а поглощает только ФАДН⁻. Вследствие этого он может восстанавливаться в ФАДН⁻, что исключает возможность формирования радикальной пары флавин/триптофан и ее модификации магнитным полем. Для прояснения вопроса о несоответствии фотохимических и биологических данных в недавней работе проведен детальный фотохимический и структурный анализ криптохрома из *C. livia* (C/CRY4). В полученных кристаллических структурах выявлены модификации в эволюционно консервативной триаде триптофанов: у C/CRY4 цепь триптофанов удлиняется за счет четвертого триптофана и остатка тирозина [31]. Это обеспечивает высокий квантовый выход реакции фотовосстановления ФАД ($\phi \sim 0,4$), превышающий соответствующие квантовые выходы у других криптохромов ($\phi \sim 0,2$). Высокий квантовый выход повышает чувствительность C/CRY4 к свету низкой интенсивности, что согласуется с наблюдением поведенческих реакций у птиц при их ориентации в магнитном поле. В целом результаты работы совместимы с ночным поведением мигрирующих позвоночных животных в условиях слабой освещенности и предсказывают фотохимические пути, которые могут обеспечивать магниточувствительность живых систем. Однако некоторые вопросы в этом направлении остаются нерешенными. Для их прояснения необходимы новые подходы к изучению поведенческих реакций организмов, а также дальнейшие фотохимические исследования криптохромов у мигрирующих птиц, которые помогут глубже понять механизмы биологической адаптации разных организмов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes // *Biochemistry (Mosc.)*. 2013. Vol. 78. N 11. P. 1238–1253.
2. Losi A., Gartner W. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012. Vol. 63. P. 49–72.
3. Schwinn K., Ferre N., Huix-Rotllant M. UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2020. Vol. 22. N 22. P. 12447–12455.
4. Liu B., Liu H., Zhong D., Lin C. Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2010. Vol. 13. N 5. P. 578–586.

5. *Chaves I., Pokorny R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L.-O., van der Horst G.T., Batschauer A., Ahmad M.* The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. Vol. 62. P. 335–364.
6. *Dasgupta A., Fuller K.K., Dunlap J.C., Loros J.J.* Seeing the world differently: variability in the photosensory mechanisms of two model fungi // *Environ. Microbiol.* 2016. Vol. 18. N 1. P. 5–20.
7. *Ozturk N.* Phylogenetic and functional classification of the photolyase/cryptochrome family // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 1. P. 104–111.
8. *Zhang M., Wang L., Zhong D.* Photolyase: dynamics and electron-transfer mechanisms of DNA repair // *Arch. Biochem. Biophys.* 2017. Vol. 632. P. 158–174.
9. *Vechtomova Y.L., Telegina T.A., Kritsky M.S.* Evolution of proteins of the DNA photolyase/cryptochrome family // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. Vol. 85. N 1. P. 131–153.
10. *Konig S., Juhas M., Jager S., Kottke T., Buchel C.* The cryptochrome-photolyase protein family in diatoms // *J. Plant Physiol.* 2017. Vol. 217. N 1. P. 15–19.
11. *Kottke T., Oldemeyer S., Wenzel S., Zou Y., Mittag M.* Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions // *J. Plant Physiol.* 2017. Vol. 217. N 1. P. 4–14.
12. *Michael A.K., Fribourgh J.L., Van Gelder R.N., Parth C.L.* Animal cryptochromes: divergent roles in light perception, circadian timekeeping and beyond // *Photochem. Photobiol.* 2017. Vol. 93. N 1. P. 128–140.
13. *Oldemeyer S., Franz S., Wenzel S., Essen L.-O., Mittag M., Kottke T.* Essential role of an unusual long-lived tyrosyl radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome aCRY // *J. Biol. Chem.* 2016. Vol. 291. N 27. P. 14062–14071.
14. *Paulus B., Bajzath C., Melin F., Heidinger L., Kromm V., Herkersdorf C., Benz U., Mann L., Stehle P., Hellwig P., Weber S., Schleicher E.* Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states // *FEBS J.* 2015. Vol. 282. N 16. P. 3175–3189.
15. *Zoltowski B.D.* Resolving cryptic aspects of cryptochrome signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 29. P. 8811–8812.
16. *Wang Q., Zuo Z., Wang X., Liu Q., Gu L., Oka Y., Lin C.* Beyond the photocycle – how cryptochromes regulate photoresponses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. Vol. 45. Pt. A. P. 120–126.
17. *Zoltowski B.D., Vaidya A.T., Top D., Widom J., Young M.W., Crane B.R.* Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome // *Nature*. 2011. Vol. 480. N 7377. P. 396–399.
18. *Franz S., Ignatz E., Wenzel S., Zielosko H., Putu E., Maestre-Reyna M., Tsai M.-D., Yamamoto J., Mittag M., Essen L.-O.* Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii* // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46. N 15. P. 8010–8022.
19. *Ahmad M.* Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2016. Vol. 33. P. 108–115.
20. *Hense A., Herman E., Oldemeyer S., Kottke T.* Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290. N 3. P. 1743–1751.
21. *Lacombat F., Espagne A., Dozova N., Plaza P., Muller P., Brettel K., Franz-Badur S., Essen L.-O.* Ultrafast oxidation of a tyrosine by proton-coupled electron transfer promotes light activation of an animal-like cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. Vol. 141. N 34. P. 13394–13409.
22. *Oldemeyer S., Haddad A.Z., Fleming G.R.* Interconnection of the antenna pigment 8-HDF and flavin facilitates red-light reception in bifunctional animal-like cryptochrome // *Biochemistry*. 2020. Vol. 59. N 4. P. 594–604.
23. *Thoing C., Oldemeyer S., Kottke T.* Microsecond deprotonation of aspartic acid and response of the α/β subdomain precede C-terminal signaling in the blue light sensor plant cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137. N 18. P. 5990–5999.
24. *Herbel V., Orth C., Wenzel R., Ahmad M., Bittl R., Batschauer A.* Lifetimes of *Arabidopsis* cryptochrome signaling states *in vivo* // *Plant J.* 2013. Vol. 74. N 4. P. 583–592.
25. *Muller P., Ahmad M.* Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286. N 24. P. 21033–21040.
26. *Wang Q., Lin C.* A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 5. P. 401–403.
27. *Gao J., Wang X., Zhang M., Bian M., Deng W., Zuo Z., Yang Z., Zhong D., Lin C.* Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of *Arabidopsis* CRY1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. Vol. 112. N 29. P. 9135–9140.
28. *Liu H., Su T., He W., Wang G., Lin C.* The universally conserved residues are not universally required for stable protein expression or functions of cryptochromes // *Mol. Biol. Evol.* 2019. Vol. 37. N 2. P. 327–340.
29. *Shao K., Zhang X., Li X., Hao Y., Huang X., Ma M., Zhang M., Yu F., Liu H., Zhang P.* The oligomeric structures of plant cryptochromes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 5. P. 480–488.
30. *Ma L., Wang X., Guan Z., Wang L., Wang Y., Zheng L., Gong Z., Shen C., Wang J., Zhang D., Liu Z., Yin P.* Structural insight into BIC-mediated inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. Vol. 27. N 5. P. 472–479.
31. *Zoltowski B.D., Chelliah Y., Wickramaratne A., Jarecha L., Karki N., Xu W., Mouritsen H., Hore P.J., Hibbs R.E., Green C.B., Takahashi J.S.* Chemical and structural analysis of a photoactive vertebrate cryptochrome from pigeon // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019. Vol. 116. N 39. P. 19449–19457.
32. *Hore P.J., Mouritsen H.* The radical-pair mechanisms of magnetoreception // *Annu. Rev. Biophys.* 2016. Vol. 4. P. 299–344.
33. *Pooam M., Arthaut L.-D., Burdick D., Link J., Martino C.F., Ahmad M.* Magnetic sensitivity mediated by the *Arabidopsis* blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark // *Planta*. 2019. Vol. 249. N 2. P. 319–332.

Поступила в редакцию 28.01.2022

После доработки 03.04.2022

Принята в печать 19.04.2022

REVIEW

Photosensory and signaling properties of cryptochromes

G.Ya. Fraikin 

*Department of Biophysics, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia
e-mail: gfraikin@yandex.ru*

The blue-light protein sensors cryptochromes compose the widespread class of photoreceptors that regulate processes of development in plants and circadian rhythms in animals and plants. These photoreceptors can also function as magnetoreceptors. During the last decade cryptochromes have been discovered and characterized in several photosynthetic algae, where they may act not only as regulatory photoreceptors, but also as photolyases catalyzing the repair of ultraviolet-induced DNA lesions. Cryptochrome proteins bind flavin adenine dinucleotide (FAD) as a chromophore in the photolyase homology region (PHR) domain and contain the cryptochrome C-terminal extension (CCE) which is joined to PHR near the FAD-binding site. The chromophore is responsible for photosensory properties of cryptochromes and CCE is essential for their signaling activities. Photosensory processes are initiated by photochemical FAD conversions involving electron/proton transfer and the formation of redox forms. These reactions lead to changes in chromophore–protein interactions. The resulting conformational transitions in protein structure provide the molecular foundation of cryptochrome signaling activity in living systems. In plants, cryptochrome protein with photoreduced FAD undergoes conformational changes causing disengagement of the PHR domain and CCE that is accompanied by the formation of functionally active dimers/tetramers of cryptochrome molecules. Photooligomerization is considered as a key process necessary for cryptochrome signaling activity, since oligomers provide the formation their complexes with variety proteins, the components of photoreceptor signaling pathways. Interactions cryptochrome–protein in such complexes changes the protein signaling activities leading to gene expression alteration and photomorphogenesis. In this review, current knowledge on photosensory and signaling properties of cryptochromes are discussed.

Keywords: *cryptochromes, photoreceptors, FAD-chromophore, redox forms, photoactivation, signaling mechanisms*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032500058–7.

Сведения об авторе

Фрайкин Григорий Яковлевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: gfraikin@yandex.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7267-2338>

ОБЗОР

УДК 612.133

Каналы TASK-1: функциональная роль в гладкомышечных клетках артерий

А.А. Швецова* , Д.К. Гайнуллина , О.С. Тарасова 

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

*e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

Изменение диаметра мелких артерий и артериол является ключевым механизмом регуляции сопротивления сосудистого русла, а также артериального давления и кровотока в органах и тканях. Тонус гладкомышечных клеток артериальных сосудов зависит от уровня мембранного потенциала, который, в свою очередь, определяется балансом деполяризующих и гиперполяризующих токов. Основным гиперполяризующим током гладкомышечных клеток является выходящий калиевый ток. Активация и открытие калиевых каналов противодействуют деполяризации, подавляют вход кальция в клетку и сокращение. Таким образом, калиевые каналы обладают антиконстрикторным влиянием в артериях. Каналы TASK-1 – представители семейства калиевых каналов, имеющие две порообразующие петли (K_{2P}), обнаружены в сосудистом русле относительно недавно. Известно, что каналы TASK-1 опосредуют выходящий калиевый ток утечки в гладкомышечных клетках артерий. Кроме того, каналы TASK-1 подвержены ряду регуляторных влияний: их активность увеличивается при повышении внеклеточного pH, уменьшается при гипоксии, а также может изменяться под действием ингаляционных/локальных анестетиков и вазоактивных веществ. Каналы TASK-1 играют важную роль в регуляции тонуса артерий малого круга кровообращения, их дисфункция является одной из причин развития артериальной легочной гипертензии. В артериях большого круга кровообращения взрослых животных влияние каналов TASK-1 в условиях нормального pH невелико или отсутствует, но может проявляться в условиях внеклеточного алкалоза. Кроме того, антиконстрикторное влияние каналов TASK-1 более выражено на ранних этапах постнатального развития. В данном обзоре изложены современные представления о функциональной роли и регуляции каналов TASK-1 в сосудистой системе.

Ключевые слова: каналы TASK-1, тонус сосудов, гладкомышечные клетки артерий, калиевые каналы, мембранный потенциал, антиконстрикторное влияние

Калиевые каналы гладкомышечных клеток (ГМК) играют ключевую роль в регуляции тонуса артерий [1]. Они опосредуют выходящий калиевый ток, что ведет к гиперполяризации мембраны ГМК и, следовательно, к снижению активности потенциал-зависимых кальциевых каналов и расширению сосуда. Таким образом, активация калиевых каналов противодействует сокращению ГМК артерий. В ГМК артерий выделяют пять функциональных типов калиевых каналов: потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v), калий-активируемые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}), калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}), АТФ-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP}) и калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли (K_{2P}) [1, 2]. Каналы K_{2P} являются наименее изученным типом калиевых каналов в сосудистой системе.

В последние годы особый интерес исследователей вызывает один из представителей K_{2P} -каналов – TASK-1 (the weak inward-rectifying K^+ (TWIK)-related acid-sensitive K^+ channel) – обладающий свойством слабого входящего выпрямления, чувствительный к кислоте калиевый канал 1 [2]. Экспрессия канала TASK-1 продемонстрирована в сосудах разных органов [3–6]. Развитие некоторых сердечно-сосудистых расстройств связывают с дисфункцией каналов TASK-1 [7–10], что определяет актуальность изучения функциональной роли этих каналов в артериях. Целью данного обзора являются обобщение современных представлений о вазомоторной роли каналов TASK-1 в артериях малого и большого кругов кровообращения, а также рассмотрение механизмов регуляции активности каналов TASK-1 веществами, вызывающими сужение и расширение кровеносных сосудов.

1. Калиевые каналы гладкой мышцы артерий — ключевые участники регуляции тонуса сосудов

В данном разделе мы кратко охарактеризуем функциональную роль и особенности регуляции калиевых каналов, представленных в ГМК артерий.

Потенциал-зависимые калиевые каналы (K_v) активируются в ответ на деполяризацию ГМК и проводят выходящий калиевый ток задержанного выпрямления [11]. В гладкой мышце артерий наиболее важны подсемейства K_{v1} , K_{v2} и K_{v7} [11]. K_{v1} - и K_{v2} -каналы имеют высокий порог активации, т.е. активируются при существенном смещении мембранного потенциала (МП) в область менее отрицательных значений [12]. K_{v7} -каналы отличаются низким порогом активации, близким к уровню потенциала покоя ГМК [12]. Считается, что в состоянии покоя наибольшую антиконстрикторную роль проявляют K_{v7} -каналы, а при выраженном сдвиге МП в сторону менее отрицательных значений растет вклад K_{v1} - и K_{v2} -каналов [1, 12].

Кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}) подвержены регуляции как МП, так и внутриклеточными ионами кальция [13]. K_{Ca} -каналы подразделяют на три класса: малой (SK_{Ca}), средней (IK_{Ca}) и большой (BK_{Ca}) проводимости. Основную роль в регуляции сокращения ГМК артерий играют BK_{Ca} -каналы [1]. IK_{Ca} -каналы встречаются в пролиферирующих ГМК [14, 15]. Наличие же SK_{Ca} -каналов в ГМК артерий показано в единичных работах [16, 17], при этом их функциональная роль в регуляции сокращения ГМК артерий остается неясной. Чувствительность BK_{Ca} -каналов к кальцию увеличивается с деполяризацией мембраны ГМК [13]. Спонтанные локальные выбросы кальция из депо саркоплазматического ретикула (кальциевые «вспышки») активируют BK_{Ca} -каналы, что приводит к гиперполяризации и расслаблению ГМК артерий [18]. Таким образом, BK_{Ca} -каналы участвуют в регуляции базального тонуса артерий по механизму отрицательной обратной связи.

Калиевые каналы входящего выпрямления (K_{ir}) обязаны своим названием способности проводить входящий калиевый ток при значениях МП, превышающих равновесный потенциал для ионов калия (E_K). Потенциал покоя ГМК меньше E_K — порядка -50 — -60 мВ [3, 19, 20]. В этих условиях K_{ir} -каналы опосредуют выходящий ток калия, однако его амплитуда невелика, поскольку пора канала с цитоплазматической стороны блокируется ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} , а также полиаминами [21, 22]. K_{ir} -каналы опосредуют расслабление гладкой мышцы артерий в ответ на умеренное повышение наружной концентрации калия (до 15 — 20 мМ), которое может происходить, например, при увеличении активности нейронов в локальных участках головного мозга [23]. Такое повышение внеклеточной концентрации калия

приводит к смещению равновесного калиевого потенциала в электроположительную сторону, в результате чего амплитуда выходящего K_{ir} -опосредуемого тока оказывается максимальной при значении мембранного потенциала, близком к потенциалу покоя ГМК. В результате происходят гиперполяризация и расслабление ГМК, расширение сосуда, и, следовательно, увеличение притока крови к активно работающим органам.

АТФ-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP}) — одно из подсемейств семейства K_{ir} . Ток через K_{ATP} не обладает свойством входящего выпрямления, но регулируется внутриклеточным АТФ [24, 25]. При недостатке АТФ, и, следовательно, увеличении соотношения АДФ/АТФ, канал активируется [26, 27]. Функциональная роль K_{ATP} -каналов в ГМК сосудов особенно ярко проявляется при усилении метаболических процессов в окружающей ткани (например, в скелетной мышце при интенсивных сокращениях). В этих условиях ГМК сосудов испытывают дефицит АТФ, что способствует открытию K_{ATP} -каналов, гиперполяризации и расслаблению [24]. Кроме того, роль K_{ATP} -каналов в регуляции сосудистого тонуса крайне значима в условиях таких патологических состояний как ишемия, гипоксия и эндотоксемия [24, 25].

Калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли (K_{2P}) были обнаружены в сосудистом русле сравнительно недавно [28]. В отличие от других семейств калиевых каналов, K_{2P} -канал образован не четырьмя, а только двумя порообразующими α -субъединицами (рис. 1). Каждая субъединица состоит из четырех трансмембранных сегментов (S1—S4). Между первым и вторым, а также третьим и четвертым сегментами находятся петли, формирующие пору канала. Таким образом, на одну субъединицу канала приходится две порообразующие петли (P1 и P2, в англоязычной литературе P-loop), отсюда и название канала — K_{2P} . K_{2P} -каналы — обширное семейство калиевых каналов, включающее в себя шесть структурно-функциональных классов [2]. В базальных условиях K_{2P} -каналы опосредуют выходящий калиевый ток, а вероятность их открытия мало зависит от разности потенциалов на мембране [2, 29], что позволяет называть их каналами утечки. Наряду с этим, разные классы K_{2P} -каналов регулируются рН, O_2 , фосфолипидами, анестетиками, а также механическими стимулами (растяжением мембраны) [2].

TASK-каналы — класс K_{2P} -каналов, чувствительных к кислоте, включающий в себя ряд представителей: каналы TASK-1, TASK-2, TASK-3, TASK-4 и TASK-5 [2]. Содержание канала TASK-1 в сосудистой системе наиболее высоко по сравнению с другими представителями TASK-каналов, а также по сравнению с другими классами K_{2P} -каналов [3—5, 30].

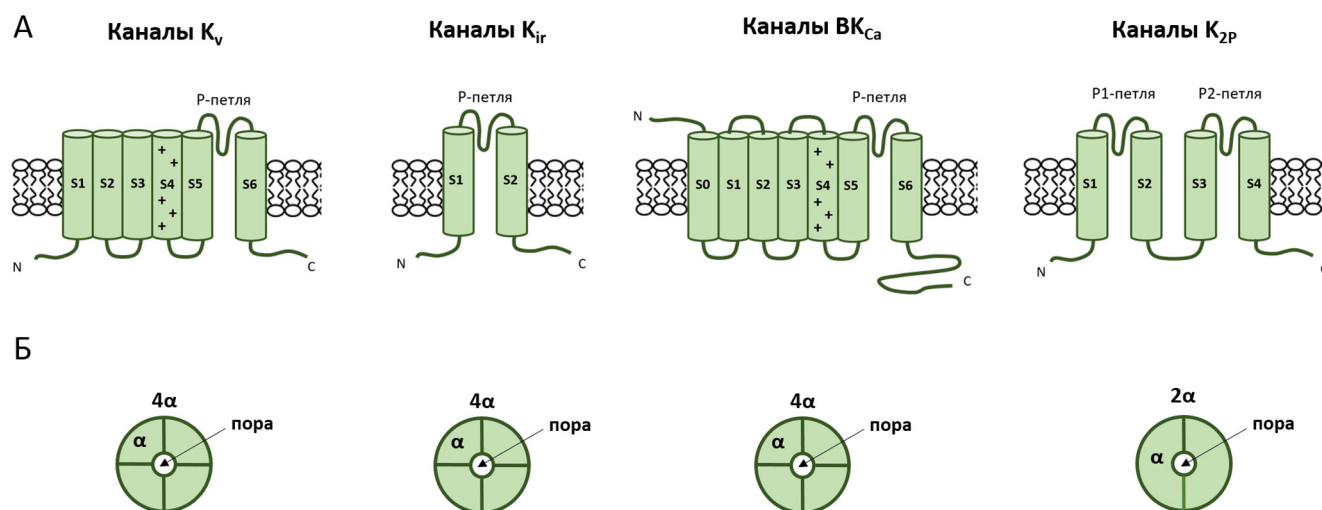


Рис. 1. А: Строение порообразующих α -субъединиц различных семейств калиевых каналов (значками «+» обозначены сегменты, обеспечивающие чувствительность K_v - и BK_{Ca} -каналов к разности потенциалов на мембране). **Б:** Количество порообразующих α -субъединиц, формирующих канал.

2. Канал TASK-1 — представитель класса чувствительных к кислоте K_{2P} -каналов

Как и другие представители семейства K_{2P} -каналов, TASK-1 являются каналами утечки [29]. В соответствии с этим, как следует из вольт-амперной характеристики канала TASK-1, зависимость амплитуды опосредуемого им тока от мембранного потенциала близка к линейной (свойство входящего выпрямления выражено слабо) [29, 31]. Отличительной особенностью класса TASK-каналов является их чувствительность к внеклеточному pH: ацидоз приводит к ингибированию, а алкалоз — к активации этих каналов [32]. Данное свойство каналов TASK-1 было продемонстрировано с использованием метода patch-clamp как при экспрессии каналов в ооцитах [31, 32], так и в изолированных ГМК артерий легких [5, 28, 33]. В обоих случаях закисление внеклеточного раствора до значений pH ниже 7,3–7,4 вызывало снижение, а защелачивание до значений pH выше 7,3–7,4 — увеличение амплитуды TASK-1-опосредуемого тока. В условиях же нормального физиологического pH 7,3–7,4 амплитуда TASK-1-опосредуемого тока имела промежуточное значение, т.е. канал TASK-1 может быть функционально активен и в условиях нормального pH. Чувствительность канала TASK-1 к закислению связывают с особой областью в структуре канала. Аминокислотные остатки гистидина (H98, входит в состав P1) и аспарагиновой кислоты (D204, входит в состав P2) образуют кольцо H98–D204–H98–D204 у внешнего устья ионселективного фильтра канала [34]. Протонирование данной области при снижении внеклеточного pH приводит к подавлению TASK-1-опосредуемого тока [34, 35].

Для калиевых каналов большинства семейств характерно взаимодействие с особыми регуляторными субъединицами, которые модулируют биофизические свойства канала. Например, регуляторная β -субъединица BK_{Ca} -канала увеличивает его чувствительность к кальцию [36]. Взаимодействие $K_v7.4$ -канала с регуляторной K_{spc4} субъединицей приводит к снижению порога активации канала [37]. Регуляторные SUR-субъединицы (SUR — sulfonyleurea receptor), придают K_{ATP} -каналам чувствительность к нуклеотидам и другим регуляторным молекулам [26, 27]. Для канала TASK-1 на настоящий момент не показано наличие регуляторных субъединиц. Тем не менее известно, что каналы TASK-1 взаимодействуют с рядом белков, которые регулируют их расположение в клетке. Показано, что взаимодействие с белком 14-3-3 способствует встраиванию канала в плазматическую мембрану [38], а взаимодействие с белками COPI и синтаксином-8 — напротив, приводит к уменьшению количества каналов TASK-1 в плазматической мембране клетки в результате их эндоцитоза или удержания во внутриклеточных компартментах (эндоплазматическом ретикулуме или аппарате Гольджи) [38, 39].

3. Фармакологические подходы к изучению функциональной роли каналов TASK-1

Общепринятым подходом для выявления влияния различных типов калиевых каналов на уровень МП и сократительную активность является использование их блокаторов и/или активаторов. В ранних исследованиях в качестве блокаторов каналов TASK-1 использовали такие вещества, как анандамид, метанандамид и бупивакаин [30, 40]. Однако существует ряд свидетельств, подтверждающих влияние этих веществ на ионные каналы,

отличные от TASK-1, причем диапазоны эффективных концентраций при «побочном действии» и блокаде каналов TASK-1 значительно перекрываются. Например, в коронарной артерии крысы анандамид способствовал развитию вазодилатации путем активации BK_{Ca} -каналов [41]. В изолированных ГМК аорты крысы анандамид и метанандамид вызывали снижение амплитуды тока, опосредуемого K_v -каналами [42]. Важно отметить, что данные эффекты исследователи связывают с прямым влиянием анандамида и метанандамида на калиевые каналы, независимо от активации каннабиноидных рецепторов. Местный анестетик бупивакаин снижал амплитуду BK_{Ca} -опосредуемого тока в изолированных ГМК пупочной артерии человека [43]. С другой стороны, показано, что некоторые ингаляционные анестетики, такие как изофлуран и галотан, могут увеличивать амплитуду TASK-1-опосредуемого тока [44]. В связи с этим в некоторых исследованиях функциональную роль каналов TASK-1 оценивали с использованием данных веществ [40]. В то же время показано, что галотан и изофлуран могут ингибировать кальциевый ток в ГМК коронарных артерий [45]. Таким образом, все рассмотренные выше вещества не являются селективными в отношении каналов TASK-1, поэтому данные, полученные с их применением, следует трактовать с осторожностью.

Относительно недавно было показано, что вещество AVE1231 (или A293) может блокировать каналы TASK-1 [46]. Изначально AVE1231 был разработан как блокатор $\text{K}_v1.5$ -каналов для использования в качестве антиаритмического препарата [47, 48]. Однако затем было обнаружено, что AVE1231 более эффективно блокирует каналы TASK-1 по сравнению с $\text{K}_v1.5$ [46]. Активность каналов TASK-1 оценивали с использованием метода patch-clamp в экспрессионной системе ооцитов шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [46]. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) каналов TASK-1 составило 0,22 мкМ, в то время как IC_{50} для $\text{K}_v1.5$ — 9,50 мкМ, то есть AVE1231 был в 43 раза более эффективен для каналов TASK-1. Это сделало возможным исследование вазомоторной роли каналов TASK-1 с помощью этого относительно селективного блокатора. Важно, что AVE1231 способен повышать сократительные реакции изолированных артерий в условиях блокады $\text{K}_v1.5$ -каналов, то есть путем избирательного влияния на активность TASK-1 [3].

4. Вазомоторная роль каналов TASK-1 в системе кровообращения

4.1. Вклад каналов TASK-1 в регуляцию тонуса артерий малого круга кровообращения

Экспрессия порообразующей субъединицы канала TASK-1 была обнаружена в ГМК легочных артерий крысы [5, 30], кролика [28] и человека [5, 33]. Соответственно, в ГМК легочных артерий

можно зарегистрировать ток, опосредованный каналами TASK-1, а антиконстрикторное влияние этих каналов в малом круге кровообращения было продемонстрировано как в экспериментах на изолированных артериях, так и на системном уровне.

В ряде работ было показано, что каналы TASK-1 обладают гиперполяризующим влиянием в артериях малого круга кровообращения [5, 33, 49]. Подавление экспрессии каналов TASK-1 с помощью малых интерферирующих РНК приводило к снижению TASK-1-опосредуемого тока и к деполяризации мембраны изолированных ГМК легочных артерий человека [33]. Схожим образом, блокада каналов TASK-1 с помощью вещества AVE1231 и мутация гена *Kcnk3*, ассоциированная с нарушением функционирования TASK-1, приводили к снижению МП ГМК легочных артерий крысы [5, 49].

Добавление анандамида и бупивакаина вызывало увеличение тонуса мелких артерий легких крысы [30]. Инкубация изолированных сегментов легочных артерий крысы с более селективным блокатором каналов TASK-1 AVE1231 способствовала усилению сократительных ответов сосудов на агонист рецепторов тромбоксана A_2 U46619 [5]. Таким образом, в норме каналы TASK-1 способствуют поддержанию потенциала покоя ГМК легочных артерий, противодействуя развитию сокращения.

Изменение МП ГМК артерий малого круга при увеличении и снижении внеклеточного pH также связано с активностью каналов TASK-1. Так, защелачивание внеклеточного раствора до pH 8,4 вызывало гиперполяризацию, а закисление до pH 6,4 — деполяризацию ГМК препаратов легочных артерий крысы [30]. В этих экспериментах совместная блокада каналов K_v , BK_{Ca} , K_{ATP} и K_{ir} не отменяла сдвиги МП ГМК при закислении и защелачивании, что указывает на ключевую роль TASK-1 в этих изменениях. Кроме того, добавление анандамида или бупивакаина в раствор с pH 8,4 приводило к сдвигу МП ГМК к уровню, характерному для pH 6,4.

Описанные выше изменения МП ГМК легочных артерий в ответ на изменения внеклеточного pH соотносятся с данными экспериментов *in vivo*: показано, что ацидоз сопровождается повышением, а алкалоз, напротив, снижением артериального давления в малом круге у свиней и кроликов [50, 51].

Легочные артерии, в отличие от системных, сокращаются в ответ на гипоксию, что важно для протекания газообмена в легких. В результате такого сужения кровь направляется в более насыщенные кислородом участки легких, что обеспечивает оптимальное соотношение между перфузией легких кровью и вентиляцией их воздухом. Поскольку гипоксия деполяризует ГМК легочных артерий [52], а каналы TASK-1 вносят

существенный вклад в поддержание потенциала покоя этих клеток, логично предположить, что индуцированная гипоксией легочная вазоконстрикция связана с подавлением функционирования каналов TASK-1. Действительно, гипоксия приводила к снижению амплитуды TASK-1-опосредуемого тока в ГМК легочных артерий человека [33, 53]. Есть основания полагать, что данная реакция реализуется с участием нерецепторной Src-тирозинкиназы (Src-киназы). Показано, что в условиях нормоксии каналы TASK-1 взаимодействуют с активной (фосфорилированной по сайту Tyr419) Src-киназой, а гипоксия снижает активность Src-киназы, вызывает дефосфорилирование канала TASK-1 и уменьшает количество каналов TASK-1, взаимодействующих с Src-киназой [53]. Эти изменения сопровождались снижением амплитуды TASK-1-опосредуемого тока, и, следовательно, деполяризацией ГМК [53]. Соответственно, ингибирование Src-киназы существенно увеличивало сопротивление сосудов легких мыши [53]. Механизм подавления активности Src-киназы под действием гипоксии не до конца понятен, он может быть связан с уменьшением влияния активных форм кислорода (АФК), которые, как известно, способны активировать Src-киназу напрямую или же опосредованно, путем подавления активности тирозиновой фосфатазы [54]. В экспериментах на ГМК легочных артерий человека было показано, что кратковременное воздействие гипоксии (в течение 5–10 мин) сопровождается снижением продукции АФК [55]. Если предположить, что АФК, продуцируемые в ГМК артерий, при нормоксии поддерживают Src-киназу в активном состоянии, уменьшение их продукции под действием гипоксии может снижать активность Src-киназы, и, следовательно, каналов TASK-1. Описанный выше механизм требует экспериментального подтверждения, однако связь индуцированного гипоксией сужения легочных сосудов с подавлением функционирования каналов TASK-1 не вызывает сомнений. Важно отметить, что чувствительность каналов TASK-1 к гипоксии не связана напрямую с закислением ткани, которое может сопутствовать гипоксии.

Увеличение сосудистого сопротивления является главной причиной развития артериальной легочной гипертензии — тяжелого заболевания, характеризующегося повышенным давлением в малом круге кровообращения. Поскольку в норме каналы TASK-1 обладают выраженным антиконстрикторным влиянием в артериях малого круга [5, 33], не удивительно, что нарушение их функционирования может служить одним из механизмов патогенеза легочной гипертензии. Действительно, были показаны снижение амплитуды TASK-1-опосредуемого тока и деполяризация мембраны ГМК легочных артерий у крыс с монокроталин-индуцированной легочной гипертен-

зией [5]. Содержание белка порообразующей субъединицы канала TASK-1 в ткани легких таких крыс было снижено по сравнению с этим показателем для контрольной группы [5]. Более того, хроническое введение здоровым крысам блокатора канала TASK-1 AVE1231 в течение 4 нед. привело к появлению ряда признаков развития легочной гипертензии: гипертрофии мышечного слоя легочных артерий и повышению систолического давления в правом желудочке [5].

На сегодняшний день описано 12 мутаций в гене *KCNK3*, кодирующем порообразующую субъединицу канала TASK-1, у пациентов, страдающих семейной и идиопатической формами артериальной легочной гипертензии [7–10]. Электрофизиологические характеристики каналов TASK-1, измененных в результате таких мутаций, исследовали в клеточных экспрессионных системах методом patch-clamp. Все исследуемые мутации привели к нарушению функционирования канала TASK-1, что проявлялось в снижении амплитуды опосредуемого им тока [7, 8]. Схожим образом, снижение содержания мРНК и белка порообразующей субъединицы канала TASK-1, а также значительное уменьшение амплитуды тока, чувствительного к блокатору канала TASK-1 AVE1231, было продемонстрировано в ГМК, выделенных из легочных артерий людей с идиопатической и семейной формами артериальной легочной гипертензии [5]. Наконец, сравнительно недавно была создана и охарактеризована линия крыс с мутацией в гене *Kcnk3*, приводящая к дисфункции канала TASK-1 и развитию легочной гипертензии [49]. Исходя из вышесказанного можно заключить, что дисфункция канала TASK-1 является одной из причин развития артериальной легочной гипертензии у человека и экспериментальных животных.

Примечательно, что мыши не являются подходящим объектом исследования функциональной роли TASK-1-каналов в малом круге кровообращения. Установлено, что электрофизиологические характеристики ГМК и сократительные ответы легочных артерий мышей, нокаутных по гену *Kcnk3*, на различные вазоконстрикторы не изменены по сравнению с реакциями артерий мышей дикого типа [56]. Кроме того, такие мыши не склонны к развитию артериальной легочной гипертензии [57]. Судя по всему, вазомоторная роль каналов TASK-1 у мышей невелика. Действительно, амплитуда TASK-1-опосредуемого тока в ГМК легочных артерий у мышей в пять раз ниже, чем у крыс [56]. Возможно, у мышей ведущую антиконстрикторную роль в артериях малого круга кровообращения играет представитель другого класса K_{2P} -каналов — TWIK-2. В пользу данного предположения говорит тот факт, что нокаут гена *Kcnk6*, кодирующего канал TWIK-2, у мышей приводил к появлению признаков артериальной ле-

точной гипертензии: увеличению систолического давления в правом желудочке, утолщению мышечного слоя легочных сосудов и усилению сократительных ответов легочных артерий на агонист рецепторов тромбоксана A_2 U46619 [58].

Итак, ключевая роль каналов TASK-1 в регуляции тонуса артерий малого круга кровообращения не вызывает сомнений. Основные функции каналов TASK-1 в легочных артериях перечислены на рис. 2. Каналы TASK-1 способствуют поддержанию потенциала покоя ГМК легочных артерий, предотвращая активацию потенциал-зависимых кальциевых каналов и вазоконстрикцию. Кроме того, каналы TASK-1 опосредуют изменение МП гладкой мышцы легочных сосудов в ответ на закисление и защелачивание внеклеточной среды. Сокращение легочных сосудов в ответ на гипоксию реализуется отчасти путем подавления активности канала TASK-1. Наконец, нарушение функционирования каналов TASK-1 является одной из причин развития артериальной легочной гипертензии.

4.2. Вклад каналов TASK-1 в регуляцию тонуса артерий большого круга кровообращения

Роль каналов TASK-1 в ГМК артерий большого круга кровообращения изучена в значительно меньшей степени по сравнению с легочными артериями. Показано, что каналы TASK-1 присутствуют в аорте [40], средней мозговой артерии [4], артериях брыжейки [30] и подкожной артерии крыс [3]. Вместе с тем есть основания полагать, что вклад каналов TASK-1 в регуляцию тонуса со-

судов в малом и большом кругах кровообращения не одинаков. Так, уровень системного артериального давления у крыс с мутацией, подавляющей активность канала TASK-1, не отличался от такового у контрольных животных [49]. Вместе с тем, давление крови в малом круге кровообращения оказалось существенно выше у крыс с мутацией канала TASK-1 [49]. Внутривенное введение AVE1231 также не оказывало влияния на системное артериальное давление у половозрелых крыс [3] и свиней [59]. Таким образом, в экспериментах *in vivo* функциональной роли каналов TASK-1 в регуляции системного артериального давления, в отличие от давления в малом круге кровообращения, не обнаружено.

В условиях *in vitro* блокада каналов TASK-1 с помощью AVE1231 не изменяла сократительные реакции мелких артерий головного мозга, сердца [60] и кожи [3] половозрелых крыс.

Роль калиевых каналов, в том числе и TASK-1, в регуляции тонуса системных артерий может изменяться в ходе постнатального онтогенеза [61]. В наших экспериментах AVE1231 значительно увеличивал базальный тонус и сократительные ответы подкожной артерии крыс в возрасте 1–2 нед., но не у взрослых животных [3]. В соответствии с этим блокада каналов TASK-1 сопровождалась более выраженной деполяризацией ГМК в артериях крысят, чем в артериях взрослых крыс [3]. Кроме того, для гладкой мышцы подкожной артерии крысят было характерно значительно более высокое содержание мРНК и белка порообразующей субъединицы канала TASK-1 [3]. Наконец,

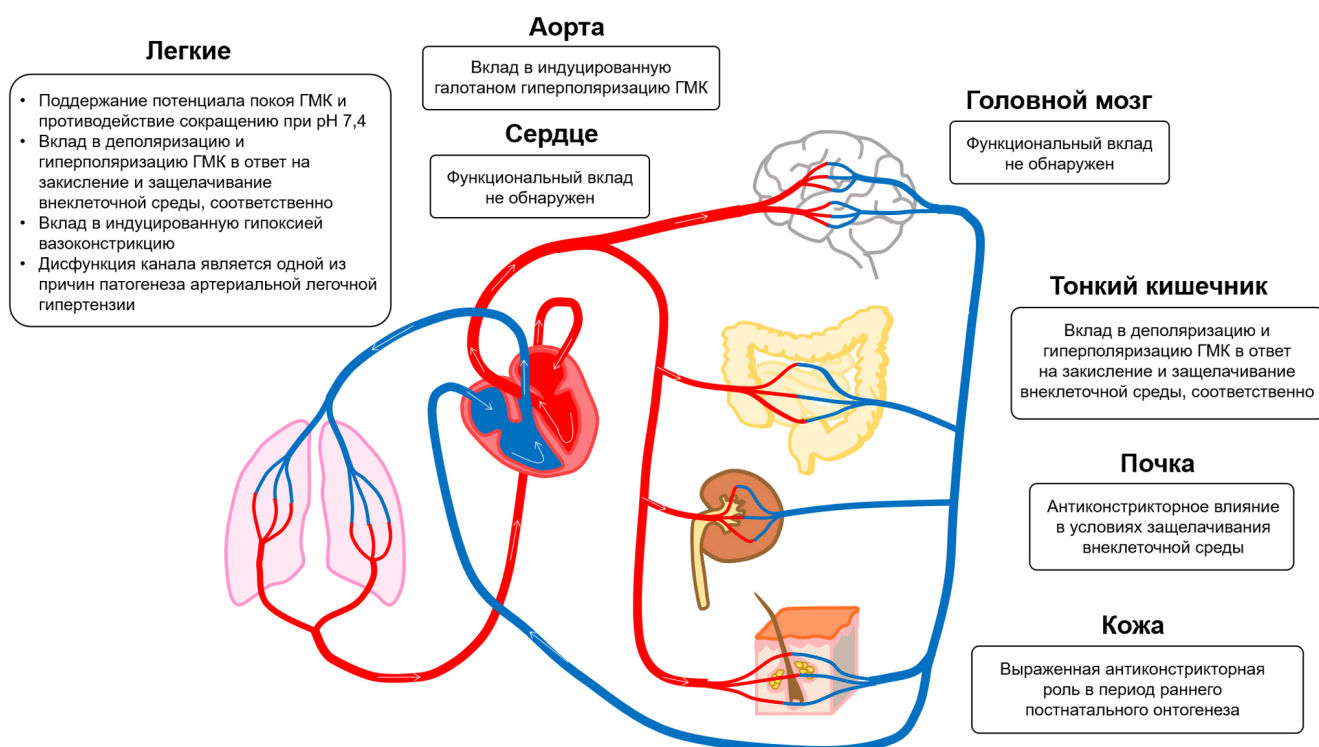


Рис. 2. Функциональная роль каналов TASK-1 в ГМК артерий разных органов.

внутривенное введение AVE1231 приводило к увеличению системного артериального давления у крысят, но не у взрослых крыс [3]. Таким образом, антиконстрикторная роль каналов TASK-1 в системных артериях снижается по мере взросления организма.

В системных артериях взрослого организма функциональная роль каналов TASK-1 может проявляться в определенных условиях, например, под действием веществ-активаторов каналов TASK-1 или при защелачивании внеклеточной среды. Так, галотан, способный активировать каналы TASK-1, вызывал гиперполяризацию ГМК аорты крысы, а ингибирование каналов TASK-1 с помощью метанандамида устраняло эффект галотана [40]. Схожим образом, повышение pH внеклеточного раствора с 7,4 до 8,4 приводило к гиперполяризации ГМК в артерии брыжейки крысы [30]. Чтобы доказать участие каналов TASK-1 в данной реакции, авторы использовали анандамид и бупивакаин. На фоне высокого pH (8,4) данные вещества вызывали деполяризацию ГМК, приближая значение МП к уровню, наблюдаемому при pH 6,4 [30]. По нашим данным, блокада TASK-1 каналов с помощью AVE1231 в условиях защелачивания внеклеточного раствора до pH 7,75 вызывает увеличение тонуса междолевых артерий почки до 20% от максимальной силы сокращения [62]. Следует отметить, что повышение pH крови вызывает снижение почечного кровотока [63]. Выраженное антиконстрикторное влияние TASK-1 каналов при щелочном внеклеточном pH может ослаблять снижение почечного кровотока и тем самым повышать способность почки компенсировать системный алкалоз.

Итак, функциональный вклад каналов TASK-1 в системных артериях в условиях нормального pH у взрослых животных невелик или отсутствует (рис. 2). Тем не менее, каналы TASK-1 могут проявлять антиконстрикторную роль на ранних этапах постнатального развития, а также в условиях внеклеточного алкалоза — по крайней мере, в некоторых сосудах большого круга кровообращения (рис. 2).

5. Регуляция активности каналов TASK-1 внутриклеточными сигнальными путями

Взаимодействие калиевых каналов с участниками внутриклеточных сигнальных каскадов, в частности, фосфорилирование протеинкиназами, является важным механизмом регуляции их активности [1]. Влияние протеинкиназ на активность основных типов калиевых каналов (K_v , BK_{Ca} , K_{ir} и K_{ATP}) обладает рядом закономерностей. Так, протеинкиназа A (protein kinase A, PKA) и протеинкиназа G (protein kinase G, PKG), активирующиеся под действием сосудорасширяющих веществ (NO, простаглицин, агонисты β -адренорецепторов и др.), повышают активность

калиевых каналов, что способствует расслаблению гладкой мышцы артерий [1]. И, наоборот, вещества, вызывающие сужение сосудов (агонисты α_1 -адренорецепторов, рецепторов тромбоксана A_2 и др.), способствуют активации протеинкиназы C (protein kinase C, PKC) или Rho-киназы (Rho-ассоциированной протеинкиназы ROCK), которые угнетают активность калиевых каналов, приводя к деполяризации и сокращению [1]. Далее мы рассмотрим, как изменяется активность каналов TASK-1 ГМК под действием вазоконстрикторов и вазодилататоров.

5.1. Вазоконстрикторы и каналы TASK-1

Секретируемый эндотелием артерий эндотелин-1 вносит существенный вклад в развитие артериальной легочной гипертензии [64]. По данным литературы, эндотелин-1 может влиять на активность каналов TASK-1 за счет разных механизмов.

В изолированных ГМК легочных артерий человека и мыши, а также в кардиомиоцитах крысы эндотелин-1 ингибировал каналы TASK-1 путем активации ET_A рецепторов (endothelin receptor type A), ассоциированных с G_q -белком (GTP-binding protein with α_q subunit, ГТФ-связывающий белок с α_q субъединицей) [63, 64]. В результате запускался сигнальный каскад фосфолипаза C (phospholipase C, PLC) — фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP_2) — диацилглицерол (diacylglycerol, DAG) — PKC, участники которого способны влиять на активность каналов TASK-1.

В кардиомиоцитах крысы снижение TASK-1-опосредуемого тока устранялось ингибитором PLC, но не PKC [66]. С другой стороны, амплитуда тока, опосредуемого каналами TASK-1, в экспрессионной системе ооцитов *Xenopus laevis*, увеличивалась под действием PIP_2 [67]. Таким образом, PIP_2 обладает положительным влиянием на активность канала TASK-1. По мнению некоторых авторов, он может быть необходим для конститутивной активности каналов TASK-1 [68]. Подавление TASK-1-опосредуемого тока под действием эндотелина-1 может быть связано с уменьшением количества PIP_2 в результате его гидролиза PLC.

В нескольких работах было показано, что снижение активности каналов TASK-1 при действии эндотелина-1 связано с активацией PKC. Так, добавление ингибиторов PKC устраняло эндотелин-индуцируемое подавление TASK-1-опосредуемого тока, а аналог DAG, напротив, подавлял TASK-1-опосредуемый ток в ГМК, изолированных из легочных артерий человека и мыши, что свидетельствует о негативном влиянии PKC на каналы TASK-1 [65]. В соответствии с этим содержание фосфорилированного канала TASK-1 значительно увеличивалось под действием эндотели-

5.2. Вазодилататоры и каналы TASK-1

Простациклин, секретируемый клетками эндотелия, вызывает расслабление гладкой мышцы артерий. Рецепторы ГМК к простациклину сопряжены с G_s -белком (GTP-binding protein with α_s subunit, ГТФ-связывающий белок с α_s -субъединицей). Активация этих рецепторов ведет к запуску сигнального каскада аденилатциклаза (adenylate cyclase, AC) — циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) — PKA. Показано, что стабильный аналог простациклина трепростинил может активировать каналы TASK-1 в ГМК легочных артерий человека, вызывая PKA-зависимое фосфорилирование TASK-1 [33].

Как и рецепторы к простациклину, β -адренорецепторы ГМК сопряжены с G_s -белком. Таким образом, активация β -адренорецепторов также приводит к вазодилатации через описанный выше сигнальный каскад [77]. Показано, что вызванные агонистом β -адренорецепторов изопrenalином гиперполяризация и расслабление легочной артерии крысы уменьшаются при подавлении активности каналов TASK-1 анандамидом или снижении pH раствора до 6,4 [78]. Это свидетельствует о том, что каналы TASK-1 могут принимать участие в расслаблении ГМК при активации β -адренорецепторов.

Еще один важный вазодилататор, секретируемый сосудистым эндотелием — оксид азота (NO). Проникая в ГМК, NO взаимодействует с растворимой гуанилатциклазой (soluble guanylate cyclase, sGC), что приводит к увеличению количества циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и активации PKG. PKG-зависимое расслабление ГМК артерий обусловлено фосфорилированием ряда мишеней, к числу которых относятся и калиевые каналы [79].

Показано, что активатор sGC риоцигулат способствует усилению TASK-1-опосредуемого тока в клеточной экспрессионной системе tsA201 (модификация эмбриональных клеток почки человека) [80], что предполагает положительное влияние сигнального пути NO — sGC — цГМФ — PKG на каналы TASK-1. В ГМК средней мозговой артерии крысы NO и аналог цГМФ также увеличивали амплитуду выходящего калиевого тока [4]. Авторы обнаружили, что содержание мРНК канала TASK-1 в этой артерии достаточно велико, а также продемонстрировали наличие сайтов фосфорилирования PKG в структуре канала TASK-1, в связи

с чем предположили участие этих каналов в реакции на NO и аналог цГМФ. Однако добавление тетраэтиламмония, к которому каналы TASK-1 не чувствительны, устраняло эффекты NO и аналога цГМФ. В итоге было сделано заключение, что расслабление средней мозговой артерии крысы в ответ на NO не связано с активацией каналов TASK-1 [4]. Тем не менее, это не исключает влияния NO на активность каналов TASK-1 в артериях других органов крысы или в артериях других млекопитающих.

Таким образом, для каналов TASK-1 ГМК артерий характерна активация путем PKA-зависимого фосфорилирования под действием агонистов рецепторов, сопряженных с G_s -белком, таких как простациклин и агонисты β -адренорецепторов (рис. 3). Что касается сигнального каскада, запускаемого NO, показаны как его положительное влияние на активность каналов TASK-1, так и отсутствие влияния. Очевидно, данный вопрос требует дальнейших исследований (рис. 3).

Итак, каналы TASK-1 играют важную роль в регуляции сосудистого тонуса, при этом их вклад в артериях малого и большого кругов кровообращения не одинаков. В артериях легких каналы TASK-1 проявляют выраженную антиконстрикторную роль при нормальном уровне pH и нормоксии, а нарушение функционирования этих каналов может являться одной из причин развития опасного заболевания — артериальной легочной гипертензии. В системных артериях функциональный вклад TASK-1 в условиях нормального pH у взрослых животных невелик, но выражен в период раннего постнатального онтогенеза. Тем не менее, в условиях внеклеточного алкалоза каналы TASK-1 проявляют антиконстрикторную роль как в легочных, так и в системных артериях. Эффекты влияния ряда вазоактивных веществ на сосудистый тонус связаны с изменением активности каналов TASK-1. Как правило, вазодилататоры способствуют активации, а вазоконстрикторы, напротив, подавлению активности каналов TASK-1 ГМК, что сходно с особенностями регуляции активности других семейств калиевых каналов.

Обзор написан при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-00027). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles // Compr. Physiol. 2017. Vol. 7. N 2. P. 485–581.
2. Gurney A., Manoury B. Two-pore potassium channels in the cardiovascular system // Eur. Biophys. J. 2009. Vol. 38. N 3. P. 305–318.

3. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Schmidt N., Bugert P., Lukoshkova E.V., Tarasova O.S., Schubert R. TASK-1 channel blockade by AVE1231 increases vasocontractile responses and BP in 1- to 2-week-old but not adult rats // Br. J. Pharmacol. 2020. Vol. 177. N 22. P. 5148–5162.
4. Lloyd E.E., Marrelli S.P., Bryan R.M. cGMP does not activate two-pore domain K^+ channels in cerebrovascu-

lar smooth muscle // *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* 2009. Vol. 296. № 6. P. 1774–1780.

5. Antigny F., Hautefort A., Meloche J., et al. Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension // *Circulation*. 2016. Vol. 133. N 14. P. 1371–1385.

6. Gardener M.J., Johnson I.T., Burnham M.P., Edward G., Heagerty A.M., Weston A.H. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries // *Br. J. Pharmacol.* 2004. Vol. 142. N 1. P. 192–202.

7. Ma L., Roman-Campos D., Austin E.D., et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension // *N. Engl. J. Med.* 2013. Vol. 369. N 4. P. 351–361.

8. Navas Tejedor P., Tenorio Castaño J., Palomino Doza J., Arias Lajara P., Gordo Trujillo G., López Meseguer M., Román Broto A., Lapunzina Abadía P., Escribano Subía P. An homozygous mutation in KCNK3 is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension // *Clin. Genet.* 2017. Vol. 91. N 3. P. 453–457.

9. Zhang H.S., Liu Q., Piao C.M., Zhu Y., Li Q.Q., Du J., Gu H. Genotypes and phenotypes of Chinese pediatric patients with idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension – a single-center study // *Can. J. Cardiol.* 2019. Vol. 35. N 12. P. 1851–1856.

10. Haarman M.G., Kerstjens-Frederikse W.S., Vissia-Kazemier T.R., Breeman K.T.N., Timens W., Vos Y.J., Roofthoof M.T.R., Hillege H.L., Berger R.M.F. The genetic epidemiology of pediatric pulmonary arterial hypertension // *J. Pediatr.* 2020. Vol. 225. P. 65–73.e5.

11. Cox R.H., Fromme S. Functional expression profile of voltage-gated K⁺ channel subunits in rat small mesenteric arteries // *Cell Biochem. Biophys.* 2016. Vol. 74. N 2. P. 263–276.

12. Mackie A.R., Byron K.L. Cardiovascular KCNQ (Kv7) potassium channels: physiological regulators and new targets for therapeutic intervention // *Mol. Pharmacol.* 2008. Vol. 74. N 5. P. 1171–1179.

13. Cui J., Yang H., Lee U.S. Molecular mechanisms of BK channel activation // *Cell. Mol. Life Sci.* 2009. Vol. 66. N 5. P. 852–875.

14. Bi D., Toyama K., Lemaitre V., Takai J., Fan F., Jenkins D.P., Wulff H., Gutterman D.D., Park F., Miura H. The intermediate conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation via controlling calcium-dependent signaling // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288. N 22. P. 15843–15853.

15. Tharp D.L., Wamhoff B.R., Turk J.R., Bowles D.K. Upregulation of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (IKCa1) mediates phenotypic modulation of coronary smooth muscle // *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291. N 5. P. H2493–H2503.

16. Gebremedhin D., Kaldunski M., Jacobs E.R., Harder D.R., Roman R.J. Coexistence of two types of Ca²⁺-activated K⁺ channels in rat renal arterioles // *Am. J. Physiol.* 1996. Vol. 270. N 1. P. 69–81.

17. Sun W.T., Hou H.T., Chen H.X., Xue H.M., Wang J., He G.W., Yang Q. Calcium-activated potassium channel family in coronary artery bypass grafts // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2021. Vol. 161. N 5. P. e399–e409.

18. Ledoux J., Werner M.E., Brayden J.E., Nelson M.T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone // *Physiology*. 2006. Vol. 21. N 1. P. 69–78.

19. Schubert R., Wesselman J.P.M., Nilsson H., Mulvaney M.J. Noradrenaline-induced depolarization is smaller in isobaric compared to isometric preparations of rat mesenteric small arteries // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 1996. Vol. 431. N 5. P. 794–796.

20. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Schubert R. Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15-day-old rats: Dominating role of Kv7 channels // *Acta Physiol.* 2019. Vol. 225. N 2: e13176.

21. Matsuda H., Saigusa A., Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K channel and blocking by internal Mg²⁺ // *Nature*. 1987. Vol. 325. N 6100. P. 156–159.

22. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification // *Nature*. 1994. Vol. 372. N 6504. P. 366–369.

23. Filosa J.A., Bonev A.D., Straub S.V., Meredith A.L., Wilkerson M.K., Aldrich R.W., Nelson M.T. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain // *Nat. Neurosci.* 2006. Vol. 9. N 11. P. 1397–1403.

24. Foster M.N., Coetzee W.A. K_{ATP} channels in the cardiovascular system // *Physiol. Rev.* 2016. Vol. 96. N 1. P. 177–252.

25. Tinker A., Aziz Q., Li Y., Specterman M. ATP-sensitive potassium channels and their physiological and pathophysiological roles // *Compr. Physiol.* 2018. Vol. 8. N 4. P. 1463–1511.

26. Tucker S.J., Gribble F.M., Zhao C., Trapp S., Ashcroft F.M. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor // *Nature*. 1997. Vol. 387. N 6629. P. 179–183.

27. Ammalia C., Moorhouse A., Gribble F., Ashfield R., Proks P., Smith P.A., Sakura H., Coles B., Ashcroft S.L.H., Ashcroft F.M. Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels // *Nature*. 1996. Vol. 379. N 6565. P. 545–548.

28. Gurney A.M., Osipenko O.N., MacMillan D., McFarlane K.M., Tate R.J., Kempster F.E.J. Two-pore domain K channel, TASK-1, in pulmonary artery smooth muscle cells // *Circ. Res.* 2003. Vol. 93. N 10. P. 957–964.

29. Goldstein S.A.N., Bockenhauer D., O'Kelly I., Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-pore domain subunits // *Nat. Rev. Neurosci.* 2001. Vol. 2. N 3. P. 175–184.

30. Gardener M.J., Johnson I.T., Burnham M.P., Edward G., Heagerty A.M., Weston A.H. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries // *Br. J. Pharmacol.* 2004. Vol. 142. N 1. P. 192–202.

31. Lopes C.M.B., Gallagher P.G., Buck M.E., Butler M.H., Goldstein S.A.N. Proton block and voltage gating are potassium-dependent in the cardiac leak channel Kcnk3 // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. N 22. P. 16969–16978.

32. Duprat F., Lesage F., Fink M., Reyes R., Heurteaux C., Lazdunski M. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 17. P. 5464–5471.

33. Olschewski A., Li Y., Tang B., Hanze J., Eul B., Bohle R.M., Wilhelm J., Morty R.E., Brau M.E., Weir E.K., Kwapiszewska G., Klepetko W., Seeger W., Olschewski H. Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells // *Circ. Res.* 2006. Vol. 98. N 8. P. 1072–1080.

34. Yuill K., Ashmole I., Stanfield P.R. The selectivity filter of the tandem pore potassium channel TASK-1 and its pH-sensitivity and ionic selectivity // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 2004. Vol. 448. N 1. P. 63–69.
35. Morton M.J., O'Connell A.D., Sivaprasadarao A., Hunter M. Determinants of pH sensing in the two-pore domain K⁺ channels TASK-1 and -2 // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 2003. Vol. 445. N 5. P. 577–583.
36. Bao L., Cox D.H. Gating and ionic currents reveal how the BKCa channel's Ca²⁺ sensitivity is enhanced by its β 1 subunit // *J. Gen. Physiol.* 2005. Vol. 126. N 4. P. 393–412.
37. Jepps T.A., Carr G., Lundegaard P.R., Olesen S.-P., Greenwood I.A. Fundamental role for the KCNE4 ancillary subunit in Kv7.4 regulation of arterial tone // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593. N 24. P. 5325–5340.
38. O'Kelly I., Goldstein S.A.N. Forward transport of K2P3.1: mediation by 14-3-3 and COPI, modulation by p11 // *Traffic.* 2008. Vol. 9. N 1. P. 72–78.
39. Renigunta V., Fischer T., Zuzarte M., Kling S., Zou X., Siebert K., Limberg M.M., Rinné S., Decher N., Schlichthörl G., Daut J. Cooperative endocytosis of the endosomal SNARE protein syntaxin-8 and the potassium channel TASK-1 // *Mol. Biol. Cell.* 2014. Vol. 25. N 12. P. 1877–1891.
40. Kiyoshi H., Yamazaki D., Ohya S., Kitsukawa M., Muraki K., Saito S., Ohizumi Y., Imaizumi Y. Molecular and electrophysiological characteristics of K⁺ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR // *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291. N 6. P. H2723–H2734.
41. White R., Ho W.S.V., Bottrill F.E., Ford W.R., Hiley C.R. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries // *Br. J. Pharmacol.* 2001. Vol. 134. N 4. P. 921–929.
42. Van den Bossche I., Vanheel B. Influence of cannabinoids on the delayed rectifier in freshly dissociated smooth muscle cells of the rat aorta // *Br. J. Pharmacol.* 2000. Vol. 131. N 1. P. 85–93.
43. Martín P., Enrique N., Palomo A.R.R., Rebolledo A., Milesi V. Bupivacaine inhibits large conductance, voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels in human umbilical artery smooth muscle cells // *Channels.* 2012. Vol. 6. N 3. P. 174–180.
44. Patel A.J., Honoré E., Lesage F., Fink M., Romey G., Lazdunski M. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels // *Nat. Neurosci.* 1999. Vol. 2. N 5. P. 422–426.
45. Buljubasic N., Rusch N.J., Marijic J., Kampine J.P., Bosnjak Z.J. Effects of halothane and isoflurane on calcium and potassium channel currents in canine coronary arterial cells // *Anesthesiology.* 1992. Vol. 76. N 6. P. 990–998.
46. Kiper A.K., Rinné S., Rolfes C., Ramírez D., Seeböhm G., Netter M.F., González W., Decher N. Kv1.5 blockers preferentially inhibit TASK-1 channels: TASK-1 as a target against atrial fibrillation and obstructive sleep apnea? // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 2015. Vol. 467. N 5. P. 1081–1090.
47. Wirth K.J., Brendel J., Steinmeyer K., Linz D.K., Rütten H., Gögelein H. *In vitro* and *in vivo* effects of the atrial selective antiarrhythmic compound AVE1231 // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2007. Vol. 49. N 4. P. 197–206.
48. Ehrlich J.R., Ocholla H., Ziemek D., Rütten H., Hohnloser S.H., Gögelein H. Characterization of human cardiac Kv1.5 inhibition by the novel atrial-selective antiarrhythmic compound AVE1231 // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008. Vol. 51. N 4. P. 380–387.
49. Lambert M., Capuano V., Boet A., et al. Characterization of *Kcnk3*-mutated rat, a novel model of pulmonary hypertension // *Circ. Res.* 2019. Vol. 125. N 7. P. 678–695.
50. Yamaguchi K., Takasugi T., Fujita H., Mori M., Oyamada Y., Suzuki K., Miyata A., Aoki T., Suzuki Y. Endothelial modulation of pH-dependent pressor response in isolated perfused rabbit lungs // *Am. J. Physiol. – Heart Circ. Physiol.* 1996. Vol. 270. N 39. P. 252–258.
51. Balasubramanyan N., Halla T.R., Ghanayem N.S., Gordon J.B. Endothelium-independent and -dependent vasodilation in alkalotic and acidotic piglet lungs // *Pediatr. Pulmonol.* 2000. Vol. 30. N 3. P. 241–248.
52. Post J.M., Hume J.R., Archer S.L., Weir E.K. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction // *Am. J. Physiol.* 1992. Vol. 262. N 4. P. C882–C890.
53. Nagaraj C., Tang B., Bálint Z., Wygrecka M., Hrzecnjak A., Kwapiszewska G., Stacher E., Lindenmann J., Weir E.K., Olschewski H., Olschewski A. Src tyrosine kinase is crucial for potassium channel function in human pulmonary arteries // *Eur. Respir. J.* 2013. Vol. 41. N 1. P. 85–95.
54. Mackay C.E., Knock G.A. Control of vascular smooth muscle function by Src-family kinases and reactive oxygen species in health and disease // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593. N 17. P. 3815–3828.
55. Wu W., Platoshyn O., Firth A.L., Yuan J.X.J. Hypoxia divergently regulates production of reactive oxygen species in human pulmonary and coronary artery smooth muscle cells // *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007. Vol. 293. N 4. P. 952–959.
56. Manoury B., Lamalle C., Oliveira R., Reid J., Gurney A.M. Contractile and electrophysiological properties of pulmonary artery smooth muscle are not altered in TASK-1 knockout mice // *J. Physiol.* 2011. Vol. 589. N 13. P. 3231–3246.
57. Murtaza G., Mermer P., Goldenberg A., Pfeil U., Paddenberger R., Weissmann N., Lochnit G., Kummer W. TASK-1 potassium channel is not critically involved in mediating hypoxic pulmonary vasoconstriction of murine intra-pulmonary arteries // *PLoS One.* 2017. Vol. 12. N 3: e0174071.
58. Pandit L.M., Lloyd E.E., Reynolds J.O., Lawrence W.S., Reynolds C., Wehrens X.H.T., Bryan R.M. TWIK-2 channel deficiency leads to pulmonary hypertension through a rho-kinase-mediated process // *Hypertension.* 2014. Vol. 64. N 6. P. 1260–1265.
59. Wiedmann F., Beyersdorf C., Zhou X.B., Kraft M., Foerster K.I., El-Battrawy I., Lang S., Borggrefe M., Haefeli W.E., Frey N., Schmidt C. The experimental TASK-1 potassium channel inhibitor A293 can be employed for rhythm control of persistent atrial fibrillation in a translational large animal model // *Front. Physiol.* 2021. Vol. 11: 629421.
60. Lazarenko V., Shvetsova A., Gaynullina D., Schubert R. P35 TASK-1 channels play an anticontractile role in rat septal coronary artery under pharmacological blockade of endothelium // *Artery Res.* 2020. Vol. 26. P. S58.
61. Shvetsova A.A., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Schubert R. Remodeling of arterial tone regulation in postnatal development: focus on smooth muscle cell potassium channels // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 11: 5413.

62. Shvetsova A., Lazarenko V., Gaynullina D., Tarasova O., Schubert R. TASK-1 channels emerge as contributors to tone regulation in renal arteries at alkaline pH // *Front. Physiol.* 2022. Vol. 13: 895863.
63. Lockett M.F. Effects of changes in pO₂ and pCO₂ and pH on the total vascular resistance of perfused cat kidneys // *J. Physiol.* 1967. Vol. 193. N 3. P. 671–678.
64. Giaid A., Yanagisawa M., Langleben D., Michel R.P., Levy R., Shennib H., Kimura S., Masaki T., Duguid W.P., Stewart D.J. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension // *N. Engl. J. Med.* 1993. Vol. 328. N 24. P. 1732–1739.
65. Tang B., Li Y., Nagaraj C., Morty R.E., Gabor S., Stacher E., Voswinckel R., Weissmann N., Leithner K., Olschewski H., Olschewski A. Endothelin-1 inhibits background two-pore domain channel TASK-1 in primary human pulmonary artery smooth muscle cells // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2009. Vol. 41. N 4. P. 476–483.
66. Schiekkel J., Lindner M., Hetzel A., Wemhöner K., Renigunta V., Schlichthörl G., Decher N., Oliver D., Daut J. The inhibition of the potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle by endothelin-1 is mediated by phospholipase C // *Cardiovasc. Res.* 2013. Vol. 97. N 1. P. 97–105.
67. Lopes C.M.B., Rohács T., Czirájk G., Balla T., Enyedi P., Logothetis D.E. PIP₂ hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels // *J. Physiol.* 2005. Vol. 564. N 1. P. 117–129.
68. Czirájk G., Petheo G.L., Spät A., Enyedi P. Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C // *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 2001. Vol. 281. N 2. P. 700–708.
69. Gabriel L., Lvov A., Orthodoxou D., Rittenhouse A.R., Kobertz W.R., Melikian H.E. The acid-sensitive, anesthetic-activated potassium leak channel, KCNK3, is regulated by 14-3-3 β -dependent, protein kinase C (PKC)-mediated endocytic trafficking // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 39. P. 32354–32366.
70. Matsuoka H., Harada K., Mashima K., Inoue M. Muscarinic receptor stimulation induces TASK1 channel endocytosis through a PKC-Pyk2-Src pathway in PC12 cells // *Cell. Signal.* 2020. Vol. 65: 109434.
71. Seyler C., Duthil-Straub E., Zitron E., Gierten J., Scholz E.P., Fink R.H.A., Karle C.A., Becker R., Katus H.A., Thomas D. TASK1 (K_{2p3.1}) K⁺ channel inhibition by endothelin-1 is mediated through Rho kinase-dependent phosphorylation // *Br. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 165. N 5. P. 1467–1475.
72. Lincoln T.M., Dey N.B., Boerth N.J., Cornwell T.L., Soff G.A. Nitric oxide – cyclic GMP pathway regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation: Implications in vascular diseases // *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998. Vol. 164. N 4. P. 507–515.
73. Zhou F., Rao F., Deng Y.Q., Yang H., Kuang S.J., Wu F.L., Wu S.L., Xue Y.M., Wu X.M., Deng C.Y. Atorvastatin ameliorates the contractile dysfunction of the aorta induced by organ culture // *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2019. Vol. 392. N 1. P. 19–28.
74. Puzdrova V.A., Kudryashova T.V., Gaynullina D.K., Mochalov S.V., Aalkjaer C., Nilsson H., Vorotnikov A.V., Schubert R., Tarasova O.S. Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca²⁺ sensitivity during early post-natal development in rats // *Acta Physiol.* 2014. Vol. 212. N 2. P. 128–141.
75. Mochalov S.V., Tarasova N.V., Kudryashova T.V., Gaynullina D.K., Kalenchuk V.U., Borovik A.S., Vorotnikov A.V., Tarasova O.S., Schubert R. Higher Ca²⁺-sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity // *Acta Physiol.* 2018. Vol. 12. N 10: e13044.
76. Hayoz S., Bychkov R., Serir K., Docquier M., Bény J.L. Purinergic activation of a leak potassium current in freshly dissociated myocytes from mouse thoracic aorta // *Acta Physiol.* 2009. Vol. 195. N 2. P. 247–258.
77. Borkowski K.R., Gros R., Schneider H. Vascular β -adrenoceptor-mediated responses in hypertension and ageing in rats // *J. Auton. Pharmacol.* 1992. Vol. 12. N 6. P. 389–455.
78. Bieger D., Parai K., Ford C.A., Tabrizchi R. β -Adrenoceptor mediated responses in rat pulmonary artery: Putative role of TASK-1 related K channels // *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2006. Vol. 373. N 3. P. 186–196.
79. Гайнуллина Д.К., Кирюхина О.О., Тарасова О.С. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия // *Усп. физиол. наук.* 2013. Т. 44. № 4. P. 88–102.
80. Cunningham K.P., Holden R.G., Escribano-Subias P.M., Cogolludo A., Veale E.L., Mathie A. Characterization and regulation of wild-type and mutant TASK-1 two pore domain potassium channels indicated in pulmonary arterial hypertension // *J. Physiol.* 2019. Vol. 597. N 4. P. 1087–1101.

Поступила в редакцию 29.03.2022

После доработки 27.04.2022

Принята в печать 16.05.2022

REVIEW

TASK-1 channels: functional role in arterial smooth muscle cells

A.A. Shvetsova* , D.K. Gaynullina , O.S. Tarasova 

*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia
e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com

A change in the diameter of small arteries and arterioles is a key mechanism for the regulation vascular bed resistance and, consequently, blood pressure and blood flow in organs and tissues. The tone of arterial smooth muscle cells (SMC) depends on the level of membrane potential (MP), which, in turn, is determined by the balance of depolarizing and hyperpolarizing ion currents. The main hyperpolarizing current of SMC is the outward potassium current.

Activation and opening of potassium channels counteract depolarization, inhibit calcium entry into the cell and contraction. Thus, potassium channels play an anticontractile role in the arteries. TASK-1 channels, members of two-pore potassium channel family (K_{2P}), have been described relatively recently in the vasculature. It is known that TASK-1 channels mediate outward potassium leakage current in arterial SMC. In addition, TASK-1 channels are regulated by a number of stimuli: their activity augments with an increase of extracellular pH, decreases at hypoxia, and can also change under the influence of inhalational/local anesthetics and vasoactive substances. TASK-1 channels play an important role in the regulation of arterial tone in pulmonary circulation, their dysfunction is one of the causes of arterial pulmonary hypertension development. In systemic arteries of adult animals, the influence of TASK-1 channels under normal pH is small or absent, but it can manifest itself under conditions of extracellular alkalosis. In addition, the anticontractile role of TASK-1 channels is more pronounced at the early period of postnatal development. This review outlines the current understanding of the functional role and regulation of TASK-1 channels in the vascular system.

Keywords: *TASK-1 channels, vascular tone, arterial smooth muscle cells, potassium channels, membrane potential, anticontractile influence*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 20-75-00027.

Сведения об авторах

Швецова Анастасия Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: anastasiashvetsova92@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8859-7689>

Гайнуллина Дина Камилевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: dina.gaynullina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5104-2399>

Тарасова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц., проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: ost.msu@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4230-384>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.65

Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам у штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, полученных из медицинского учреждения**Р.Р. Еникеев* , Н.Ю. Татарина , Л.М. Захарчук , Е.Н. Виноградова ***Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com*

Получены изоляты штаммов бактерий, доминирующих на поверхностях оборудования медицинской лаборатории для отбора анализов крови. Чистые культуры этих бактерий идентифицированы как *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA12, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus subtilis* HSA06, *Bacillus amyloliquefaciens* HSA09. Определена устойчивость бактерий к ряду β-лактамов антибиотиков и спектиномицину. Все штаммы устойчивы к пенициллину и ампициллину со значением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) от 256 до 2048 мкг/мл, а также к антибиотикам цефалоспоринового ряда со значением МИК от 2 до 2048 мкг/мл. Резистентность бактерий к спектиномицину, применяемому у пациентов с аллергией на пенициллины и цефалоспорины, находится в диапазоне МИК от 16 до 256 мкг/мл.

У *B. cereus* HSA01 устойчивость к ампициллину и цефуроксиму обусловлена работой эффлюкс-насосов, к цефтазидиму обеспечивается действием металло-β-лактамаз (МБЛ), а к пенициллину объясняется работой обеих этих систем. Высокая устойчивость к ампициллину *B. cereus* HSA12 обеспечивается действием МБЛ, к цефуроксиму — активностью эффлюкса, в то время как резистентность к цефтазидиму сопровождается наличием МБЛ и действием эффлюкс-насосов. У *B. cereus* HSA03 резистентность к пенициллину, ампициллину, цефепиму и цефтазидиму объясняется активностью эффлюкса, к цефазолину и цефтазидиму обеспечивается действием МБЛ, а к ампициллину и цефтазидиму обусловлена наличием как МБЛ, так и эффлюкса. Устойчивость *B. subtilis* HSA06 к пенициллину и ампициллину обеспечивает только активность МБЛ. У *B. amyloliquefaciens* HSA09 устойчивость к ампициллину объясняется как наличием МБЛ, так и действием эффлюкс-насосов, а к пенициллину обеспечивается только действием эффлюкса.

Таким образом, у исследованной группы бацилл резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринов обеспечивают, в зависимости от штамма и конкретного антибиотика, металло-β-лактамазы и/или эффлюкс-насосы. Насосы относятся к группе второстепенных транспортеров.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, устойчивость к антибиотикам, минимальная ингибирующая концентрация, эффлюкс-насосы, активность β-лактамаз, асептические помещения

Любая обитаемая среда на Земле, в которой люди проводят большую часть своего времени, характеризуется определенным микробным сообществом. Воздушное пространство и рабочие поверхности большинства рабочих помещений подвергаются очистке от микроорганизмов с помощью систем естественной вентиляции и влажной уборки с применением моющих веществ. Только в некоторых специальных помещениях — операционных, родильных отделениях, палатах интенсивной терапии, лабораториях для отбора проб крови, асептических комнатах для производства медицинских препаратов количество микроорганизмов в воздухе и на поверхностях оборудования поддерживается на минимальном уровне с помощью бактериальных фильтров, ультрафиолетового облучения и дезинфицирующих растворов.

Одним из видов таких асептических помещений являются лабораторные комнаты для отбора проб крови. Эти помещения являются агрессивной для микроорганизмов средой обитания в связи с постоянным воздействием УФ-излучения и регулярным использованием различных дезинфицирующих средств. В основе микробной контаминации таких помещений лежит постоянный приток новых посетителей, как правило, подвергающихся лечению антибиотиками и имеющих низкий иммунный статус. В результате на рабочих поверхностях лабораторных комнат выживают штаммы бактерий, устойчивых к дезинфицирующим растворам и часто обладающие множественной лекарственной

устойчивостью (МЛУ) [1]. Резистентные к УФ-излучению и дезинфицирующим средствам (чаще всего спорообразующие) бактерии, способны вызывать множество заболеваний у человека. Так установлено, что бактерии рода *Bacillus* являются возбудителями многих заболеваний, особенно у людей со сниженным иммунитетом [2–4]. Однако информации о клинических характеристиках бактерий, обитающих в чистых комнатах и асептических помещениях, еще очень мало. Известно, что МЛУ у бактерий может быть обусловлена одним или одновременно несколькими механизмами [1].

Целями работы были выделение из лаборатории для отбора проб крови изолятов бактерий рода *Bacillus*, их идентификация, изучение устойчивости к ряду клинически значимых β -лактамов антибиотиков и определение возможных механизмов этой резистентности.

Материалы и методы

Исследовали бактерии, выделенные из смывов рабочих поверхностей оборудования больницы лаборатория, предназначенной для отбора проб крови. Отбор проб, получение изолятов и чистых культур выполняли аналогично забору и анализу проб из Российского сегмента международной космической станции [5]. Пробы отбирали до начала работы лаборатории, через 10 мин после ночного УФ-облучения и утренней антисептической обработки рабочих поверхностей дезрастворами. Идентификацию бактерий осуществляли путем анализа генов 16S рРНК [6]. Выделение ДНК из клеток штаммов, выращенных на жидкой среде с мясо-пептонным бульоном (МПБ) и 1% глюкозы, проводили с помощью комплекта реактивов Genomic DNA Purification Kit КО 512 (Thermo Scientific, США) по методике, рекомендуемой разработчиками этого комплекта реактивов. Амплификацию гена 16S рРНК проводили с использованием праймеров (Синтол, Россия) B63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') и B1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Полученные фрагменты ДНК разделяли в агарозном геле с помощью электрофореза (120 В). Агарозный гель готовили, добавляя агарозу (1–1,2%) в 1× трис-ацетатный (ТАЕ) буфер, нагревали до 90–95 °С, перемешивали до полного растворения агарозы, добавляли 7,5 мкл раствора бромистого этидия на каждые 150 мл раствора, охлаждали до 45–50 °С и заливали в специальную форму. После полимеризации гель переносили в электрофорезную горизонтальную камеру Mini-SubCellGT (Bio-Rad, США). В образцы с фрагментами ДНК добавляли буфер в объемном соотношении 1:5. Электрофоретическое разделение проводили в буфере 1× ТАЕ. Фрагменты нуклеиновых кислот определяли в УФ-свете. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABIPRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Thermo

Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Scientific, США). Для видовой идентификации проводили сравнение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК с базой данных GenBank. Сходство штаммов с ближайшим гомологом гена 16S рРНК составляло 99,1–99,6%. Для подтверждения данных по идентификации бактерий, полученных анализом генов 16S рРНК, их идентификацию проводили также методом масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией – MALDI-ToF [7]. Идентификация микроорганизмов была осуществлена на приборе MALDI-Tof autoflex III L200 Biotyper (Bruker, Германия). Определение значения минимальной ингибирующей концентрации антибиотиков (МИК) проводили методом их последовательных двукратных разведений с использованием 96-луночных планшетов (Eppendorf, Германия), как описано ранее [5]. Получали суточную культуру бактерий в МПБ с 1% глюкозы с оптической плотностью 1,0 (OD 600 нм), затем суспензию клеток разбавляли МПБ до оптической плотности 0,1 (OD 600 нм) и вносили в лунки. Далее в лунки вносили антибиотик так, чтобы его концентрация в лунке первого ряда 12-рядного планшета составляла 4096 мкг/мл с последующим двукратным разведением в лунках следующих 11 рядов до концентрации 2 мкг/мл. Для оценки роста бактерий в каждую лунку добавляли резазурин (Sigma, США) до концентрации 50 мкМ. В последнем выпуске The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>. EUCAST, v.12.0. 2022) критерии интерпретации для оценки устойчивости *Bacillus* spp. к цефалоспорином отсутствуют, но присутствуют для очень близких по механизму и спектру действия к цефалоспорином антибиотикам – представителям класса β -лактамов антибиотиков широкого спектра действия – имипенему и меропенему (карбапенемы). При этом значения МИК имипенема для устойчивых к нему штаммов комплекса *Bacillus cereus* приводятся в диапазоне выше 0,5 мкг/мл. Таким образом, в случае цефалоспоринов можно считать устойчивыми к ним все штаммы *Bacillus* spp. со значениями МИК этих антибиотиков выше 2 мкг/мл.

Для определения активности эфлюкса в 96-луночный планшет вносили питательную среду и соответствующий антибиотик в концентрации от 4096 до 1 мкг/мл, а затем в каждую лунку добавляли протонофор – карбонилцианид-3-хлорфенилгидразон (carbonyl-cyanide-3-chlorophenylhydrazone, СССР, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. В качестве контролей использовали лунки с антибиотиком, но без добавления СССР и лунки, содержащие только питательную среду с культурой и СССР. О влиянии

СССР на рост судили, добавляя резазурин в концентрации 50 мкМ [8]. Активность эффлюкса оценивали по отношению кратности уменьшения (КУ) МИК антибиотиков в культурах без СССР к значениям МИК при его добавлении. При величине КУ < 4 отмечали отсутствие эффлюкса, при КУ в диапазоне от 4 до 16 регистрировали его умеренную активность, а при КУ > 16 фиксировали высокую активность [8].

Для оценки активности металло-β-лактамаз (МБЛ) использовали метод дисков с ЭДТА [9, 10]. Суспензию клеток распределяли по поверхности агара Мюллера-Хинтона. Затем в центр среды помещали диск с 10 мкл 0,5 М раствора ЭДТА, а на расстоянии 15 мм от него диски с антибиотиками. Образование зоны подавления роста бактериального газона между диском с ЭДТА и диском, содержащим антибиотик, расценивали как наличие продукции МБЛ у тестируемой бактерии. Гены клинически значимых лактамаз детектировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (Real-Time PCR, RT-PCR) с помощью набора «Гены VIM, NDM, OXA-48, KPC, обуславливающие резистентность к карбапенемам, природным и полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином I, II, III и IV поколений» (Литех, Россия), согласно инструкции производителя. Бактериальную ДНК для этого выделяли с помощью набора ДНК-сорб (Интерлабсервис, Россия). Все опыты проводили трехкратно в двух повторностях в каждой серии. Результаты в их конечном виде (приведенные в таблицах) получали путем вычисления среднего арифметического ($\bar{X}$) из результатов всех повторностей (X_n) при условии, что они различались не более чем на 10% ($|X_n - \bar{X}| \leq 0,05 \bar{X}$). При этом расчет среднего арифметического проводили, исключая «сомнительные результаты» («X»), не входящие в доверительный интервал $|X_n - \bar{X}| = t \cdot \sigma$, где $\bar{X}$ — среднее арифметическое без учета «сомнительных результатов», t — нормированное отклонение при $P_{0,95}$ для малых выборок ($n < 30$), а σ — среднее квадратичное отклонение ($\pm \sqrt{(\sum(X_n - \bar{X})^2 / (n - 1))}$ без учета «X».

Результаты и обсуждение

Получение и идентификация культур. В процессе получения изолятов бактерий по макроморфологическим (колонии на плотной среде) и микроморфологическим (морфология клеток под микроскопом) характеристикам из двадцати изолятов были отобраны пять, доминирующих по частоте встречаемости их колоний на плотных средах. Результаты идентификации чистых культур до вида, которые были осуществлены анализом последовательностей 16S рРНК и анализом белков методом MALDI-ToF, полностью совпали. Бактерии идентифицированы как *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA12, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus subtilis* HSA06 и *Bacillus amyloliquefaciens* HSA09.

Определение МИК. Исследована устойчивость бактерий к ряду β-лактамных антибиотиков — пенициллину, ампициллину, производным цефалоспоринов I-го (цефазолин), II-го (цефуроксим), III-го (цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим), IV-го (цефепим) поколений и спектиномицину. Спектиномицин не относится к β-лактамным антибиотикам и используется в качестве резервного препарата в случаях невозможности лечения пациентов цефалоспорином третьего и четвертого поколений из-за аллергических реакций (табл. 1). Три из выделенных штаммов бактерий — *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03 показали очень высокую резистентность к пенициллину и ампициллину со значением МИК 2048 мкг/мл (табл. 1). Устойчивость *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 к пенициллину и ампициллину оказалась ниже. Значения МИК для этих антибиотиков у *B. amyloliquefaciens* HSA09 составляли 1024 мкг/мл, а у *B. subtilis* HSA06 — 256 мкг/мл (табл. 1). Устойчивость *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03 к антибиотикам цефалоспоринового ряда оказалась в несколько раз ниже, чем к пенициллину и ампициллину, однако значения МИК были достаточно высокими и составляли от 64 до 1024 мкг/мл. В отличие от этого штаммы *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 показали устойчивость только к традиционным антибиотикам ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл, в то время как устойчивость этих штаммов к цефалоспорином I–IV-го поколений цефазолину, цефуроксиму, цефтриаксону, цефоперазону, цефтазидиму и цефепиму была низкой со значениями МИК 2–4 мкг/мл. Все пять штаммов бацилл показали резистентность к спектиномицину в диапазоне МИК от 16 мкг/мл у *B. subtilis* HSA06 до 265 мкг/мл у *B. cereus* HSA01 (табл. 1).

Определение наличия эффлюкса. Эффлюкс является одним из основных механизмов защиты клеток от антибиотиков [11]. Возможность функционирования эффлюкс-насосов определяли для тех антибиотиков, к которым у бактерий была обнаружена высокая резистентность (табл. 1). Установлено, что у *B. cereus* HSA01 в присутствии пенициллина или ампициллина активность эффлюкса высокая, так как кратность уменьшения значения МИК каждого из этих антибиотиков в присутствии СССР в среде составляла 32. У *B. cereus* HSA03 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 активность эффлюкса в присутствии пенициллина или ампициллина умеренная. В то же время у *B. cereus* HSA12 и *B. subtilis* HSA06 наличие СССР в среде с этими антибиотиками не выявило функционирования эффлюкса (табл. 2).

Для изучения эффлюкса у *B. cereus* HSA01 были отобраны также цефуроксим, цефтазидим, цефепим (как цефалоспорины II, III и IV поколений, к которым у штамма HSA01 обнаружена высокая резистентность) и спектиномицин (как

антибиотик, заведомо не подверженный действию β -лактамазы и к которому штамм HSA01 проявил высокую устойчивость с МИК 256 мкг/мл). Показана умеренная активность эффлюкс-насосов у *B. cereus* HSA01 только в отношении цефуроксима и полное отсутствие эффлюкса при наличии в среде других антибиотиков (табл. 2).

У *B. cereus* HSA12 действие эффлюкса исследовали в отношении цефепима, цефтазида и цефуроксима с МИК 1024 мкг/мл, а также цефтриаксона и цефазолина с МИК 512 и 128 мкг/мл соответственно. Наличие умеренной активности эффлюкса обнаружено только в присутствии цефтазида и цефуроксима (табл. 2).

Действие эффлюкса у *B. cereus* HSA03 изучали в вариантах с цефазолином, цефуроксимом, цефтазидимом и цефепимом со значениями их МИК 128, 1024, 256 и 1024 мкг/мл соответственно

(табл. 2). Умеренная активность эффлюкс-насосов показана только в отношении цефепима и цефтазида (табл. 2).

Определение активности β -лактамаз. Наряду с системой эффлюкса устойчивость бактерий к β -лактамам антибиотикам может обеспечиваться также наличием у них ферментов β -лактамаз, разрушающих эти антибиотики. Различают сериновые β -лактамазы молекулярных классов С, А, D и МБЛ класса В [12]. На рис. 1 показан результат типичного опыта по выявлению МБЛ, относящихся к классу В, по образованию зоны подавления роста бактериального газона *B. cereus* HSA03 между диском, содержащим ЭДТА в центре чашки, и дисками, содержащими цефазолин и цефтазидим. Исследование наличия МБЛ у *B. cereus* HSA01 с помощью ЭДТА-теста показало наличие МБЛ-активности в отношении пеницил-

Таблица 1

МИК антибиотиков (мкг/мл) у штаммов бактерий рода *Bacillus*

Штамм	Ампициллин	Пенициллин	Цефазолин	Цефуроксим	Цефтриаксон	Цефоперазон	Цефтазидим	Цефепим	Спектиномицин
<i>Bacillus cereus</i> HSA01	2048	2048	64	1024	128	128	512	512	256
<i>Bacillus cereus</i> HSA12	2048	2048	128	1024	512	128	1024	1024	128
<i>Bacillus cereus</i> HSA03	2048	2048	128	1024	256	128	256	1024	64
<i>Bacillus subtilis</i> HSA 06	256	256	2	4	2	2	4	2	16
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HSA09	1024	1024	2	2	2	2	2	2	64

Таблица 2

Значения МИК антибиотиков, активность эффлюкс-насосов и наличие β -лактамаз у штаммов бактерий для пенициллина, ампициллина и некоторых цефалоспоринов

Микроорганизм	Антибиотик	МИК мкг/мл	МИК мкг/мл + СССР	Кратность уменьшения	Активность эффлюкса	Металло- β -лактамазы (ЭДТА-тест)	Лактамазы NDM, VIM (класс В), KPC (класс А), OXA-48 (класс D)
<i>B. cereus</i> HSA01	Ампициллин	2048	64	32	Высокая	—	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA01	Пенициллин	2048	64	32	Высокая	+	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефепим	512	512	1	Отсутствует	—	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефтазидим	512	512	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA01	Цефуроксим	1024	128	8	Умеренная	н/о	
<i>B. cereus</i> HSA01	Спектиномицин	256	256	1	Отсутствует	н/о	
<i>B. cereus</i> HSA12	Ампициллин	2048	2048	1	Отсутствует	+	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA12	Пенициллин	2048	2048	1	Отсутствует	—	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефепим	1024	1024	1	Отсутствует	—	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефазолин	128	128	1	Отсутствует	—	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефтазидим	1024	128	8	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефтриаксон	512	512	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA12	Цефуроксим	1024	128	8	Умеренная	н/о	Не обнаружено
<i>B. cereus</i> HSA03	Ампициллин	2048	128	16	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Пенициллин	2048	128	16	Умеренная	—	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефепим	1024	128	8	Умеренная	—	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефазолин	128	128	1	Отсутствует	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефтазидим	256	32	8	Умеренная	+	
<i>B. cereus</i> HSA03	Цефуроксим	1024	1024	1	Отсутствует	н/о	Не обнаружено
<i>B. subtilis</i> HSA06	Ампициллин	256	256	1	Отсутствует	+	
<i>B. subtilis</i> HSA06	Пенициллин	256	128	2	Отсутствует	+	Не обнаружено
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	Ампициллин	1024	256	4	Умеренная	+	
<i>B. amyloliquefaciens</i> HSA09	Пенициллин	1024	128	8	Умеренная	—	Не обнаружено

Знак «н/о» означает, что МБЛ для этих антибиотиков не определяли.

лина и цефтазидима (табл. 2). У *B. cereus* HSA12 тест выявил МБЛ, гидролизующие ампициллин, а также цефалоспорины III-го поколения цефтазидим и цефтриаксон с МИК этих антибиотиков 2048, 1024 и 512 мкг/мл соответственно. У *B. cereus* HSA03 МБЛ-активность обнаружена в отношении ампициллина, цефазолина и цефтазидима (табл. 2). Штамм *B. subtilis* HSA06 отличается очень низкими значениями МИК в отношении всех исследуемых антибиотиков-цефалоспоринов, но характеризуется достаточно высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 256 мкг/мл (табл. 1). У этого штамма ЭДТА-тест показал наличие МБЛ, гидролизующих оба этих антибиотика, в то время как активность эффлюкса у этого штамма в присутствии ампициллина и пенициллина отсутствует (табл. 2). *B. amyloliquefaciens* HSA09, характеризующийся очень низкими значениями МИК в отношении исследуемых антибиотиков цефалоспоринового ряда, но отличающийся высокой устойчивостью к ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл (табл. 1), показал умеренную активность эффлюкса в отношении этих двух антибиотиков, однако активность МБЛ обнаружена только к ампициллину (табл. 2).

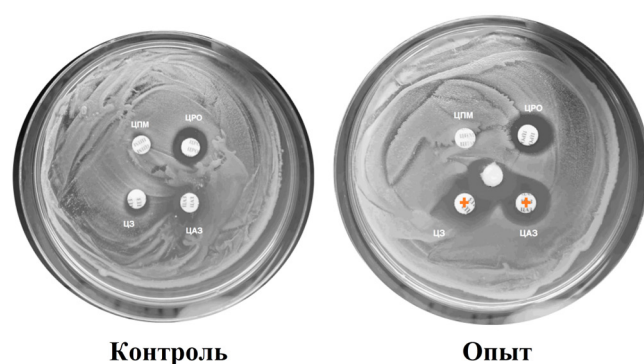


Рисунок. Определение наличия металло- β -лактамаз. Зона подавления роста *B. cereus* HSA03 возникла между дисками с ЭДТА, цефазолином и цефтазидимом.

Цефепим (ЦПМ);
Цефтриаксон (ЦРО);
Цефазолин (ЦЗ);
Цефтазидим (ЦАЗ).

Кроме методики выявления активности МБЛ (класс В) с помощью ЭДТА-теста, применялась также методика RT-PCR определения как сериновых β -лактамаз, так и МБЛ типов КРС (класс А), NDM, VIM (класс В) и OXA-48 (класс D). Однако в группе исследуемых бактерий ни один из перечисленных типов β -лактамаз выявить не удалось (табл. 2).

Исследование микробного состава замкнутых помещений выявило преобладание в них бактерий родов *Staphylococcus* и *Bacillus* [5, 13–15]. Наличие бацилл связано с их способностью образовывать эндоспоры, что объясняет чрезвычайно высокую устойчивость к высушиванию, обработке дезрастворами, УФ-излучению и недостатку питатель-

ных веществ [16]. Многие виды бацилл, кроме *B. anthracis*, являются оппортунистическими и даже патогенными [2–4]. Бациллярные инфекции разделяют на три группы. Первая и вторая группы болезней вызываются в основном *B. cereus*, *B. sphaericus* и *B. thuringiensis*. Это поражения глаз и инфекции глубоких тканей. Третью группу заболеваний представляют инфекции, вызванные диссеминированием клеток бацилл из очага поражения лимфогенным или гематогенным путями по всему организму. Возникают бактериемия, эндокардит, менингит и другие формы генерализованной бактериальной инфекции. Основным видом, вызывающим такие инфекции, является *B. cereus*. [3, 17, 18]. Следовательно, *B. cereus* является наиболее опасным для человека, за исключением *B. anthracis*, видом бацилл. При этом *B. cereus* формирует особую группу, включающую *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* и *B. anthracis* [4, 18]. Показано, что некорректная антибиотикотерапия вызывает высокий уровень смертности у пациентов с бактериемией, вызванной *B. cereus* [3, 19]. Антимикробные препараты для эмпирической терапии должны выбираться в соответствии с чувствительностью к ним возбудителя. Однако еще мало данных о клинических характеристиках штаммов *B. cereus*, вызывающих инфекции системы кровообращения (bloodstream infections, BSI) и их эмпирической терапии. BSI-инфекции чаще всего связаны с такими факторами передачи, как аппараты искусственной вентиляции легких и венозные внутрисосудистые катетеры [17]. Таким образом, наш выбор в качестве объекта исследования поверхностей оборудования лаборатории для забора проб крови был оправданным.

Причиной появления в медицинской лаборатории бактерий, резистентных к антибиотикам, могут быть мутации, появившиеся в результате обработки оборудования различными дезинфектантами и УФ-лучами. Очень высока вероятность попадания в лабораторию устойчивых к противомикробным препаратам бактерий также с потоком посетителей, особенно с низким иммунным статусом, подвергавшихся в течение долгих лет лечению антибиотиками в неконтролируемых дозах [3, 13]. Устойчивость к антибиотикам у попадающих в лабораторию с посетителями штаммов бацилл могла появиться и в результате переноса в них генов с помощью плазмид — в частности от стафилококков [13, 14, 20, 21]. Исследованные нами штаммы бактерий могли приобрести один из известных механизмов защиты от антибиотиков. Мы исследовали возможность функционирования у наших штаммов двух механизмов защиты — эффлюкс и β -лактамазная активность.

У бактерий гены, кодирующие эффлюксные белки, находятся в хромосомах или плазмидах, поэтому способны передаваться в результате

горизонтального переноса. А возникающие мутации приводят к повышенной экспрессии генов, кодирующих эффлюкс-насосы для выведения из клетки часто нескольких препаратов [22]. Различают семейства первичных и второстепенных насосов. Первичные транспортеры включают семейство ABC, которое действует за счет гидролиза АТФ, а в группу второстепенных эффлюкс-насосов входят семейства MFS, SMR, RND, MATE, функционирующие за счет мембранного электрохимического потенциала [21, 22]. У представителей рода *Bacillus* обнаружены насосы всех известных семейств [23]. Изучение структуры эффлюкс-насосов у бактерий группы *B. cereus*, три из которых — *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* являются патогенами людей, животных и насекомых, показало, что у штаммов этих видов функционирует, соответственно, по 93, 93 и 103 системы эффлюкса из всех известных семейств. Однако большинство идентифицированных систем оттока антибиотиков были классифицированы в пределах семейств MFS (более 50 насосов у каждого из трех штаммов) или ABC (до 35 транспортных систем) и всего от 3 до 5 эффлюкс-насосов каждого из семейств RND, MATE и SMR [22]. Характер влияния СССР на действие антибиотиков (табл. 2) и данные литературы позволяют считать, что транспортеры, обнаруженные у исследованных нами штаммов бацилл, вероятно, относятся к второстепенным транспортерам семейства MFS. Результаты, свидетельствующие о том, что функционирование эффлюкс-систем, регистрируемое в присутствии одного антибиотика не обнаруживается при действии других препаратов с аналогичным механизмом действия (табл. 2), можно объяснить тем, что у каждого штамма *B. cereus* могут функционировать одновременно десятки систем эффлюкса. У *B. cereus* ATCC 14579 в геноме обнаружено 28, 53, 4, 4, и 3 системы насосов, принадлежащих к семействам ABC, MFS, MATE, SMR, и RND соответственно. У исследуемых бактерий не определяли наличие первичных насосов семейства ABC [23]. Количеством, разнообразием и соотношением разных семейств эффлюкса у каждого штамма бацилл, функционирующих одновременно и с разной эффективностью в отношении разных по структуре антибиотиков, может быть обусловлено также наличие или отсутствие эффлюкса по отношению к определенному антибиотику у разных штаммов *B. cereus*. Кроме того, у каждого штамма, кроме эффлюкса, могут работать и другие механизмы защиты, действующие одновременно с оттоком.

Определение активности МБЛ с помощью ЭДТА-теста показало, что она выявлялась чаще всего в отношении ампициллина — у *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03, *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 и реже в присутствии пенициллина — у *B. cereus* HSA01 и *B. subtilis* HSA06

(табл. 2). ЭДТА-тест обнаружил действие МБЛ также в отношении цефтазидима у *B. cereus* HSA01, *B. cereus* HSA12, *B. cereus* HSA03, а при наличии цефтриаксона у *B. cereus* HSA12 и цефазолина — у *B. cereus* HSA03 (табл. 2). *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. licheniformis* являлись одними из первых объектов биохимических исследований β -лактамаз, на результатах которых были основаны будущие исследования β -лактамаз и их классификация [12]. Были описаны четыре молекулярных класса β -лактамаз (А, В, С и D) на основе размера молекулы и гомологии между аминокислотными последовательностями активного центра, и считалось, что ферменты класса D существуют только у граммотрицательных бактерий. Но недавно ферменты класса D были обнаружены у *B. pumilus*, *B. subtilis* и *B. atrophaeus* [24]. Общее количество всех уникальных лактамаз, принадлежащих к более чем 20 семействам и 4 классам, составляет около 2800 [12]. Идентификация β -лактамаз до класса возможна на основе реакций с ингибитором лактамаз класса А клавулановой кислотой, ингибитором серин-лактамаз широкого спектра действия авибактамом и хелатором ионов металлов ЭДТА для идентификации МБЛ [12]. У штаммов бацилл, исследуемых с помощью ЭДТА-теста, показана активность МБЛ, относящихся к классу В (табл. 2). Однако методом RT-PCR обнаружить β -лактамазы определенных семейств — NDM, VIM, (класс В), KPC (класс А) и OXA-48 (класс D) не удалось ни у одной из исследуемых бактерий (табл. 2). МБЛ сгруппированы в соответствии со сходством последовательностей и координацией цинка в три подкласса: В1, В2 и В3. Показано, что МБЛ BcII у *B. cereus* относится к подклассу В1, куда входят также ферменты семейств BcII, CcrA, IMP-1, BlaB, SPM-1, VIM-2 и NDM-1 [12, 25]. Следовательно, МБЛ этих семейств и семейства IMP, наличие которых мы еще не исследовали методом RT-PCR, необходимо в дальнейшем изучить у выделенных бацилл. С помощью ЭДТА-теста МБЛ (класс В) обнаружены у всех штаммов исследуемых бацилл (табл. 2). Однако отсутствие активности МБЛ у этих бацилл в присутствии некоторых антибиотиков (табл. 2), свидетельствует о необходимости применять наряду с ЭДТА-тестом другие методики обнаружения МБЛ, поскольку чувствительность этого метода может зависеть как от особенностей штамма бактерий, так и от свойств конкретного антибиотика, например, в присутствии цефепима ни у одного штамма бацилл действие МБЛ обнаружить не удалось. Следует отметить, что у бактерий рода *Bacillus* наряду с действием эффлюкса и β -лактамазами, в отношении β -лактамов может функционировать и такой механизм антибиотикостойчивости, как модификация мишени [26, 27]. В вегетативных и спорулирующих клетках *B. cereus* было обнаружено 8 основных типов пе-

нициллинсвязывающих белков (ПСБ) бактериальных мембран. Изучено сродство этих ПСБ к β -лактамам цефалоспоринового ряда цефалексину, цефокситину и цефотаксиму [26]. Следовательно, у бактерий рода *Bacillus* могут одновременно функционировать по крайней мере несколько механизмов защиты от антибиотиков — действие эффлюкса, β -лактамаз и модификация мишени. Эти механизмы могут функционировать одновременно, но вклад каждого из них зависит как от штамма бактерий, так и конкретного антибиотика.

Таким образом, среди штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных с поверхностей оборудования медицинской лаборатории для отбора анализов крови, преобладали известные способностью вызывать ряд заболеваний человека штаммы *B. cereus*. Все три представителя *B. cereus* показали высокую устойчивость к ампициллину и пенициллину со значением МИК 2048 мкг/мл и ряду β -лактамных антибиотиков цефалоспоринового ряда I–IV-го поколений в диапазоне

64–1024 мкг/мл (табл. 1). В отличие от этого, штаммы *B. subtilis* HSA06 и *B. amyloliquefaciens* HSA09 показали устойчивость только к традиционным антибиотикам ампициллину и пенициллину с МИК 1024 мкг/мл, в то время как значения МИК для цефазолина, цефуроксима, цефтриаксона, цефоперазона, цефтазидима и цефепима составляли только 2–4 мкг/мл. У исследованной группы бацилл резистентность к пенициллину, ампициллину и ряду производных цефалоспоринов обеспечивают, в зависимости от штамма и конкретного антибиотика, МБЛ и/или эффлюкс-насосы. Насосы относятся к группе второстепенных транспортеров.

Исследование осуществлялось в рамках научного проекта по выполнению государственного задания МГУ № 23-1-21 (регистрационный номер ЦИТИС 121032300094-7) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // Annu. Rev. Biochem. 2009. Vol. 78. P. 119–146.
2. Farrar W.E., Reboli A.C. The genus *Bacillus*—Medical // The Prokaryotes. Handbook on the biology of bacteria, vol. 4. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt. N.Y.: Springer-Verlag, 2006. P. 609–630.
3. Bianco A., Capozzi L., Monno M.R., Del Sambio L., Manzulli V., Pesole G., Loconsole D., Parisi A. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from human bacteremia by whole-genome sequencing // Front. Microbiol. 2021. Vol. 11: 599524.
4. Ehling-Schulz M., Koehler T.M., Lereclus D. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with pathogenic potential // Gram-positive pathogens. 3rd Ed. / Eds. V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, M. Braunstein, and J.I. Rood. Washington: ASM Press, 2019. P. 875–902.
5. Yenikeev R.R., Tatarinova N.Y., Zakhar-chuk L.M. Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples delivered from the International Space Station // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 4. P. 224–230.
6. Janda J.M., Abbot S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls // J. Clin. Microbiol. 2007. Vol. 45. N 9. P. 2761–2764.
7. Hrabak J., Chudackova E., Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis // Clin. Microbiol. Rev. 2013. Vol. 26. N 1. P. 103–114.
8. Ardebili A., Lari A.R., Talebi M. Correlation of ciprofloxacin resistance with the AdeABC efflux system in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // Ann. Lab. Med. 2014. Vol. 34. N 6. P. 433–438.
9. Aoki N., Ishii Y., Tateda K., Saga T., Kimura S., Kikuchi Y., Kobayashi T., Tanabe Y., Tsukada H., Gejyo F., Yamaguchi K. Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo- β -lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. Vol. 54. N 11. P. 4582–4588.
10. Лазарева А.В., Крыжановская О.А., Бочарова Ю.А., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Распространенность металл- β -лактамаз и эффлюкс-механизмов у карбапенемрезистентных госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в г. Москве в 2012–2015 гг. // Вестн. РАМН. 2015. Т. 70. № 6. С. 679–683.
11. Li X.Z., Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria // Drugs. 2004. Vol. 64. N 2. P. 159–204.
12. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases // Antimicrob. Agents Chemother. 2018. Vol. 62. N 10: e01076-18.
13. Timmerly S., Hu X., Mahillon J. Characterization of bacilli isolated from the confined environments of the Antarctic Concordia station and the International Space Station // Astrobiology. 2011. Vol. 11. N 4. P. 323–334.
14. Coil D.A., Neches R.Y., Lang J.M., Brown W.E., Severance M., Cavalier D.D., Eisen J.A. Growth of 48 built environment bacterial isolates on

board the International Space Station (ISS) // Peer J. 2016. Vol. 4: e1842.

15. Moissl-Eichinger C., Cockell C., Rettberg P. Venturing into new realms? Microorganisms in space // FEMS Microbiol. Rev. 2016. Vol. 40. N 5. P. 722–737.

16. Horneck G., Moeller R., Cadet J., Douki T., Rocco L., Mancinelli R.L., Wayne L., Nicholson W.L., Panitz C., Rabbow E., Rettberg P., Spry A., Stackebrandt E., Vaishampayan P., Venkateswaran K.J. Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes – Experiment PROTECT of the EXPOSE-E Mission // Astrobiology. 2012. Vol. 12. N 5. P. 445–456.

17. Uchino Y., Iriyama N., Matsumoto K., Hirabayashi Y., Miura K., Kurita D., Kobayashi Y., Yagi M., Kodaira H., Hojo A., Kobayashi S., Hatta Y., Takeuchi J. A case series of *Bacillus cereus* septicemia in patients with hematological disease // Intern. Med. 2012. Vol. 51. N 19. P. 2733–2738.

18. Schmid P.J., Maitz S., Kittinger C. *Bacillus cereus* in packaging material: Molecular and phenotypic diversity revealed // Front. Microbiol. 2021. Vol. 12: 698974.

19. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012 // Crit. Care Med. 2013. Vol. 41. N 2. P. 580–637.

20. Nolivos S., Cayron J., Dedieu A., Page A., Delolme F., Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multi-drug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer // Science. 2019. Vol. 364. N 6442. P. 778–782.

21. Foster T.J. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects // FEMS Microbiol. Rev. 2017. Vol. 41. N 3. P. 430–449.

22. Baranova N., Elkins C.A. Antimicrobial drug efflux pumps in other gram-positive bacteria // efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria. Mechanisms, regulation and clinical implications / Eds. X. Li, C.A. Elkins, and H.I. Zgurskaya. Springer Publ., 2016. P. 197–218.

23. Hassan K.A., Fagerlund A., Elbourne L.D.H., Voros A., Kroeger J.K., Simm R., Tourasse N.J., Finke S., Henderson P.J.F., Okstad J.A., Paulsen I.T., Kolsato A. The putative drug efflux systems of the *Bacillus cereus* group // PLoS One. 2017. Vol. 12. N 5. P. 35.

24. Stewart N.K., Bhattacharya M., Toth M., Smith C.A., Vakulenko S.B. A surface loop modulates activity of the *Bacillus* class D β -lactamases // J. Struct. Biol. 2020. Vol. 211. N 2: 107544.

25. Karsisiotis A.I., Damblon C.F., Gordon C.K., Roberts G.C.K. Solution structures of the *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase BcII and its complex with the broad spectrum inhibitor R-thiomandelic acid // Biochem J. 2013. Vol. 456. N 3. P. 397–407.

26. Miyamoto T., Sukimoto K., Sayed A., Kim S., Honjoh K., Hatano S. Detection of penicillin-binding proteins in *Bacillus cereus* by using biotinylated β -lactams // J. Fac. Agric. Kyushu Univ. 2000. Vol. 44. N 3. P. 299–307.

27. van Duijkeren E., Schink A.K., Roberts M.C., Wang Y., Schwarz S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents // Microbiol. Spectr. 2017. Vol. 6. N 2. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017>.

Поступила в редакцию 21.12.2022

После доработки 16.04.2022

Принята в печать 13.05.2022

RESEARCH ARTICLE

Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics in strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples obtained from a medical institution

R.R. Yenikeev*, N.Y. Tatarinova, L.M. Zakharchuk, E.N. Vinogradova

Department of Microbiology, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com

Isolates of bacterial strains dominating on the surfaces of medical laboratory equipment for the selection of blood tests were obtained. Pure cultures of these bacteria are identified as *Bacillus cereus* HSA01, *Bacillus cereus* HSA12, *Bacillus cereus* HSA03, *Bacillus subtilis* HSA06, *Bacillus amyloliquefaciens* HSA09. The resistance of bacteria to a number β -lactam antibiotics and spectinomycin was determined. All strains are resistant to penicillin and ampicillin with a minimum inhibitory concentration (MIC) from 256 to 2048 $\mu\text{g/ml}$, as well as to cephalosporin antibiotics with a MIC value from 2 to 2048 $\mu\text{g/ml}$. Bacterial resistance to spectinomycin used in patients with allergy to penicillins and cephalosporins is in the MIC range from 16 to 256 $\mu\text{g/ml}$.

In *B. cereus* HSA01, resistance to ampicillin and cefuroxime is due to the operation of efflux pumps, to ceftazidime is provided by the action of metal- β -lactamases (MBL), and to penicillin is explained by the operation of both these systems. High resistance to ampicillin *B. cereus* HSA12 is provided by the action of MBL, to cefuroxime – by efflux activity, while resistance to ceftazidime is accompanied by the presence of MBL and the action of efflux pumps. In *B. cereus* HSA03, resistance to penicillin, ampicillin, cefepime, and ceftazidime is explained by efflux activity, to cefazolin and ceftazidime is provided by MBL, and to ampicillin and ceftazidime is due to the presence of both MBL and efflux. The resistance of *B. subtilis* HSA06 to penicillin and ampicillin is provided only by MBL activity. In *B. amyloliquefaciens* HSA09, resistance to ampicillin is explained by both the presence of MBL and efflux pumps, and to penicillin is provided only by the action of efflux.

Thus, in the studied group of bacilli, resistance to penicillin, ampicillin and a number of cephalosporin derivatives is provided, depending on the strain and the specific antibiotic, of metal- β -lactamase and/or efflux pumps. Pumps function due to the electrochemical potential of the cell membrane and belong to the group of secondary transporters.

Keywords: *Bacteria of the genus Bacillus, antibiotic resistance, minimum inhibitory concentration, efflux pumps, β -lactamase activity, aseptic rooms*

Сведения об авторах

Еникеев Радмир Рустамович – аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: radmir.yenikeev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8467-9051>

Татарина Наталья Юрьевна – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: nata.tatarinova53@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9883-5780>

Захарчук Леонид Михайлович – докт. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: zakharchuk@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3783-3279>

Виноградова Елизавета Николаевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42 23; e-mail: lizavin@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4936-2593>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

Особенности окисления катионов Mn(II) в мембранных препаратах фотосистемы 2 без кислород-выделяющего комплекса. Эволюционный аспект**Е.Р. Ловягина* , Л.Н. Давлетшина , 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: elena.lovayagina@gmail.com*

Одним из основных этапов в процессе трансформации энергии света в окислительных организмах является извлечение электронов из воды, которые необходимы для световой стадии фотосинтеза. Светозависимое окисление воды осуществляется кислород-выделяющим комплексом (КВК), каталитическим центром которого является кластер Mn_4CaO_5 . КВК расположен в фотосистеме 2 (ФС2) с внутренней стороны тилакоидной мембраны. Эволюционное происхождение ФС2 неясно, так же, как и происхождение марганцевого кластера в КВК. Недавно Джонсон с соавторами (2013) предположили, что в первичной ФС2 в Архейском периоде кластер Mn_4CaO_5 отсутствовал, а ФС2 окисляла не воду, а катионы Mn(II), т.е. источником электронов были катионы марганца. В представленной работе мы исследовали возможность влияния некоторых факторов окружающей среды (ионы цитрата и пероксид водорода) на скорость окисления катионов Mn(II) ФС2, не содержащей КВК. Мы установили, что цитрат ингибирует окисление катионов марганца, связывая их, но не экстрагирует катионы марганца из КВК. Пероксид водорода, наоборот, значительно увеличивает скорость окисления марганца (с 28 ± 2 до 145 ± 7 мкмоль 2,6-дихлорофенолиндофенола (мг хлорофилла) $^{-1} \cdot ч^{-1}$ в присутствии пероксида водорода). Подобные эффекты следует учитывать при исследовании процесса окисления катионов марганца фотосистемой как возможного источника электронов на ранних стадиях эволюции.

Ключевые слова: эволюция фотосистем, фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, марганец, цитрат, пероксид водорода

Фотосинтетический пигмент-белковый комплекс, называемый фотосистема 2 (ФС2), реализует фундаментальную биоэнергетическую реакцию в фотосинтезирующих окислительных организмах (растения, водоросли, цианобактерии) — окисление воды, которая сопровождается синтезом молекулярного кислорода, выбрасываемого в атмосферу. Осуществляется эта реакция кислород-выделяющим комплексом (КВК), центром которого является кластер Mn_4CaO_5 . Молекулярная структура этого кластера с высоким разрешением $1,9 \text{ \AA}$ была определена с использованием рентгеноструктурного анализа [1] и подтверждена в последующей работе с применением фемтосекундной лазерной техники [2], позволяющей исследовать кристаллы ФС2 без сопутствующего их повреждения рентгеновским излучением. Кластер имеет форму неправильного куба, в котором три катиона марганца и катион Ca^{2+} соединены между собой кислородными мостиками. С кубом двумя кислородными мостиками (O4 и O5) соединен четвертый катион Mn. Поглощение квантов света

первичным донором ФС2 приводит к окислению катионов марганца, электроны которых используются в дальнейших процессах синтеза биомассы посредством фиксации CO_2 . После поглощения четырех квантов света происходит окисление двух молекул воды и восстановление марганцевого кластера до исходного состояния. Однако, несмотря на наличие информации об атомной структуре кластера Mn_4CaO_5 , принцип его работы во многом остается неясным.

Фактически первичным источником электронов, используемых ФС2, являются катионы марганца, и это послужило основанием для гипотезы эволюционного происхождения КВК, предложенной Джонсоном с соавт. [3]. Согласно этой гипотезе протофотосистема 2, имеющая первичный донор с очень большим редокс-потенциалом, до появления КВК могла использовать в качестве донора электронов не молекулы воды, а катионы Mn(II). В то же время фотосинтетические бактериальные реакционные центры (РЦ) 2-го типа, являющиеся эволюционными предшественника-

ми ФС2, могли использовать в качестве источника электронов комплексы катионов марганца с бикарбонатом, имеющие гораздо меньший редокс-потенциал, что обеспечивало возможность их окисления бактериальными РЦ, первичный донор которых имеет относительно низкий редокс-потенциал [4, 5]. Действительно, анализ геологических и геохимических данных осадочных образцов из южной Африки (палеопротерозойский период, возраст >2,4 млрд лет) показал большое содержание осадочных пород марганца, демонстрирующее интенсивное окисление катионов марганца, хотя содержание кислорода в воде и атмосфере в этот период было довольно низким. Необходимо отметить, что в случае данного варианта эволюционного развития возможность окисления катионов марганца, растворенных в воде, протофотосистемой 2 могла иметь место только при наличии в фотосистеме первичного донора с высоким редокс-потенциалом (около 1,2 В) типа P680, способным обеспечивать окисление этих катионов. Недавно был предложен механизм, предполагающий возможность участия в эволюционном развитии окислительного фотосинтеза более примитивных фотосистем 2-го типа, имеющих первичные доноры с гораздо меньшим редокс-потенциалом. Исследуя возможность участия бикарбоната в работе КВК, Климов с соавт. обнаружили, что комплекс катиона марганца с бикарбонатом, имеющий достаточно низкий редокс-потенциал 0,52–0,68 В [6], способен окисляться бактериальными РЦ 2-го типа [4, 7–9], а при определенных условиях и фотосистемой 1 [5]. Эти результаты значительно расширяют возможную роль процесса окисления катионов $Mn(II)$ в эволюционном развитии окислительного фотосинтеза.

Недавно Чернев с соавт. [10] получили дополнительные доказательства, поддерживающие гипотезу Джонсона и соавт. [3]. Они обнаружили, что светозависимое окисление катионов $Mn(II)$ ФС2 без КВК [ФС2(-Mn)] сопровождается образованием наночастиц окиси $Mn(III, IV)$ типа бернессита, которые могли быть прототипом марганцевого кластера современных кислород-выделяющих организмов. Однако следует отметить, что реакция окисления катионов $Mn(II)$ ФС2(-Mn) может быть чувствительна к факторам окружающей среды, так как в современных организмах центр окисления КВК защищен белковым слоем из периферических белков, не пропускающим молекулы и ионы. В то же время ФС2(-Mn) не содержит таких белков, и центр окисления катионов $Mn(II)$ доступен для потенциально вредных факторов, которые могут влиять на реакцию окисления этих катионов. Например, недавно мы показали, что на процесс окисления $Mn(II)$ существенно влияют катионы $Fe(II)$, которые могут эффективно связываться с Mn -связывающим участком и блокировать его [11]. В настоящей ра-

боте мы исследовали влияние органических кислот (цитрат-ионы) и пероксида водорода на процесс окисления катионов $Mn(II)$ в препаратах ФС2(-Mn).

Материалы и методы

Препараты ФС2, способные к фотоиндуцированному выделению молекулярного кислорода, получали согласно ранее опубликованной методике [12] из листьев рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. Препараты хранили при температуре $-80^{\circ}C$ в буфере А следующего состава: 400 мМ сахароза, 15 мМ NaCl, 50 мМ MES/NaOH, pH 6,5. Экстракцию катионов марганца из КВК препаратов ФС2 осуществляли путем обработки их 0,8 М Трис-HCl буфером (pH 8,5) при концентрации хлорофилла 0,5 мг/мл в течение 15 мин при комнатном освещении ($5 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и температуре $22^{\circ}C$. Полученные препараты ФС2(-Mn) переводили в буфер А посредством центрифугирования $16100g \times 5$ мин и дважды отмывали от экстрагированных катионов $Mn(II)$ и остатков Трис-буфера. Такая обработка препаратов ФС2 удаляла не только Mn -кластер, но и ионы Ca^{2+} , а также все периферические белки ФС2. Остаточное количество катионов марганца не превышало $0,2 \pm 0,1 \text{ Мн/РЦ}$, что соответствует литературным данным ($\leq 0,2 \text{ Мн/РЦ}$ [10]). Концентрацию хлорофилла определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно ранее описанному методу [13].

Фотоиндуцированную скорость электронного транспорта в препаратах ФС2(-Mn) регистрировали фотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кювете с четырьмя отполированными гранями (длина оптического пути 0,5 см). Источником возбуждающего света был светодиод XBDROY (Cree Inc., США) с максимумом излучения 450 нм и насыщающей интенсивностью света $1500 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Для отсекающего возбуждающего света перед фотоэлектронным умножителем спектрофотометра устанавливали оранжевый стеклянный светофильтр ОС-14. В качестве окрашенного акцептора электронов использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ), обесцвечивающийся при восстановлении. Фотоиндуцированные изменения оптической плотности регистрировали при длине волны 600 нм — максимуме поглощения синей формы ДХФИФ. Концентрация ДХФИФ во всех измерениях составляла 40 мкМ. Скорость восстановления ДХФИФ определяли за первые 15 с освещения препаратов насыщающим светом (по тангенсу угла наклона линейного участка кинетической кривой). Для расчетов использовали коэффициент молярной экстинкции депротонированной формы ДХФИФ, равный $21,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [14].

Количество катионов марганца в КВК контролировали с помощью метода колориметрического определения концентрации $Mn(II)$ [15]

с небольшими изменениями, изложенными ранее [16]. Суспензию препаратов ФС2 в буфере А (концентрация хлорофилла 100 мкг/мл) инкубировали с 50 мМ CaCl_2 при 5 °С в темноте в течение 2 мин для удаления неспецифически связанных ионов Mn [17, 18]. Затем мембраны ФС2 осаждали и осадок ресуспендировали в 0,6 Н HCl в объемном соотношении 1:9 для экстракции функционального Mn из КВК. После 10-кратного разбавления дистиллированной водой суспензию центрифугировали ($15000g \times 3$ мин) и супернатант фильтровали через нейлоновую мембрану с порами 0,2 мкм (Pall Life Sciences, Ann Arbor, США). К 0,9 мл фильтрата последовательно добавляли 40 мкл 2 М NaOH , 40 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (100 мг в 100 мл 0,1 М HCl) и 40 мкл 5,3 М H_3PO_4 . Для определения концентрации Mn(II) регистрировали поглощение при 450 нм (коэффициент экстинкции $34 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [19]. При расчете концентрации РЦ ФС2 принимали количество молекул хлорофилла на РЦ равным 250 [20].

Обработку препаратов ФС2(-Mn) средой с pH 3,0 проводили следующим образом. Размороженные препараты ФС2(-Mn) с помощью центрифугирования переводили в цитратный буфер следующего состава: 400 мМ сахароза, 15 мМ NaCl , 15 мМ лимонная кислота/цитрат Na, pH 3,0. Инкубацию проводили при концентрации хлорофилла 100 мкг/мл в течение 3 мин в темноте при комнатной температуре. Перед измерением скорости электронного транспорта препарат разбавляли в 5 раз буфером А для создания pH среды 6,4.

Результаты и обсуждение

В процессе эволюционного развития РЦ 2-го типа до появления Mn_4CaO_5 кластера и образования КВК фотосистема могла использовать в качестве источника электронов вместо воды другие доноры электронов, в том числе пероксид водорода [21]. Пероксид водорода имеет небольшой среднеточечный потенциал $E_m = 0,27 \text{ В}$ [21], допускающий возможность окисления его первичным донором бактериального РЦ второго типа. Бланкеншип и Хантер [21] предположили, что пероксид водорода мог быть донором электронов для протофотосистемы 2 и в его окислении могла принимать участие Mn-содержащая каталаза. Однако позже Дисмюкс с соавторами [4] отметили две причины малой убедительности этой гипотезы. Во-первых, нет очевидной гомологии между Mn-каталазой и Mn-связывающим доменом в КВК, а во-вторых, нет доказательств существования обильного источника пероксида водорода в Архейский период.

Тем не менее, в случае участия катионов марганца в качестве донора электронов пероксид водорода может играть существенную роль. Суть ее заключается в том, что пероксид водорода значительно увеличивает скорость окисления катионов

Mn(II) в ФС2 без марганцевого/кальциевого кластера. Механизм этого эффекта состоит в следующем: катион Mn(II) связывается с высокоаффинным Mn-связывающим участком в ФС2(-Mn), окисляется радикалом редокс-активного остатка тирозина-161 белка D1 (Y_Z'), после чего катион Mn(III) восстанавливается пероксидом водорода [22–24]. Это приводит к значительному увеличению скорости окисления катионов марганца в ФС2(-Mn). На рис. 1 показаны типичные примеры кинетики окисления Mn(II) препаратами ФС2(-Mn) в отсутствие (кривая 2) и в присутствии (кривая 3) пероксида водорода. Результаты демонстрируют, что скорость окисления Mn(II) в присутствии 3 мМ пероксида водорода увеличивается с 28 ± 2 до 145 ± 7 мкмоль ДХФИФ $\cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$. Полученные величины скорости окисления Mn(II) в присутствии пероксида достаточно близки к величинам, определенным нами ранее (около 180 и 120 мкмоль ДХФИФ $\cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ [25, 26]), но существенно меньше значений, опубликованных Иноу с соавт. ($370\text{--}420$ мкмоль ДХФИФ $\cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) [27, 28]. Это отличие может быть обусловлено разными методами получения препаратов ФС2, сортом и качеством шпината, составом инкубационной среды. Кроме того, причиной значительного разброса в величинах регистрируемых скоростей восстановления ДХФИФ может быть использование ненасыщающей концентрации акцептора (40 мкМ) из-за высокой оптической плотности, в то время как насыщающая его концентрация составляет 80 мкМ. Скорость светозависимого восстановления ДХФИФ в мембранных препаратах ФС2(-Mn), поддерживаемая другим электронным донором — 1,5-дифенилкарбазидом, донирующим электроны в ФС2(-Mn) через два участка — высокоаффинный и низкоаффинный [29], также достаточно сильно варьирует и может составлять, например, 90 [26] или 163 [25] мкмоль ДХФИФ $\cdot (\text{мг хлорофилла})^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, что в среднем близко к величине скорости окисления донорной пары $[\text{Mn(II)} + \text{H}_2\text{O}_2]$ (см. выше).

На скорость окисления катионов Mn(II) могут влиять и органические соединения, способные связывать катионы металлов. К таким соединениям относятся органические кислоты [30]. В представленной работе мы исследовали влияние лимонной кислоты на процесс окисления катионов марганца в препаратах ФС2(-Mn). Выбор этой кислоты обусловлен тем, что она достаточно часто используется в исследованиях роли катиона Ca^{2+} в КВК ФС2 [31] и не влияет на процесс окисления воды в реконструированных препаратах после их обработки цитратом. На рис. 2 представлены результаты измерения концентрационной зависимости скорости окисления Mn(II) препаратом ФС2(-Mn) в буфере без цитрата натрия (кривая 1) и в присутствии 3 мМ цитрат-ионов (кривая 2).

Поскольку катионы Mn(II) окисляются таким препаратом с довольно низкой скоростью (28 ± 2 мкмоль ДХФИФ $\cdot$ (мг хлорофилла) $^{-1} \cdot$ ч $^{-1}$, см. рис. 1), в эксперименте регистрировали скорость их окисления в присутствии пероксида водорода, который увеличивает ее более чем в 5 раз (рис. 1, кривая 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитрат ингибирует процесс окисления Mn и происходит это за счет связывания катиона цитрат-ионом. Константа диссоциации (K1) комплекса цитрат-Mn(II) имеет небольшую величину 3,7 [30], что объясняет донирование электронов (около 40%) при концентрации Mn(II) 2 мкМ и цитрата 3 мМ, а также 100%-ное донирование при повышении концентрации Mn(II) до 100 мкМ (при концентрации цитрата 3 мМ). Низкая эффективность взаимодействия цитрат-ионов с Mn не позволяет им экстрагировать марганец из марганцевого кластера КВК, однако неспецифически связанные с мембраной катионы марганца (около 0,4 Mn на 250 молекул хлорофилла в мембранном препарате ФС2) цитрат удаляет (таблица 1). Эта величина соответствует количеству неспецифически связанных катионов Mn (0,6 Mn/400 молекул хлорофилла в тилакоидах), определенному ранее [17]. Обычно перед определением содержания Mn в ФС2 осуществляется процедура удаления неспецифически связанных катионов, и с этой целью препарат обрабатывают 50 мМ раствором Ca²⁺ [17, 18]. Полученные нами результаты показывают, что с этой же целью может быть использован и цитрат-ион.

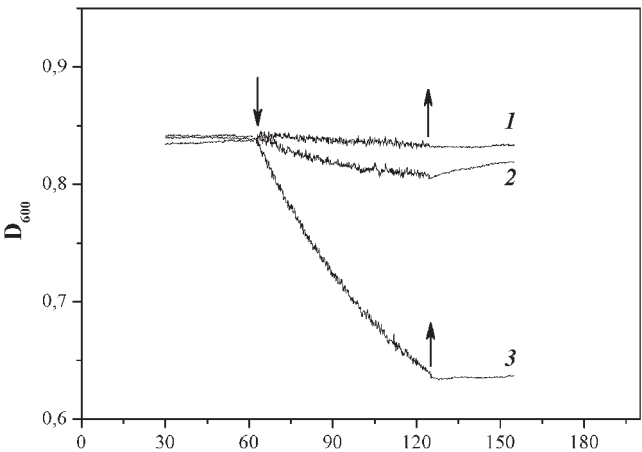


Рис. 1. Кинетические кривые фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ (2,6-дихлорофенолиндофенола) мембранными препаратами ФС2(-Mn) при длине волны 600 нм. 1 – в отсутствие экзогенного донора электронов; 2 – в качестве донора электронов использованы катионы Mn(II) (50 мкМ); 3 – в качестве донора электронов использованы катионы Mn(II) (2 мкМ) в сочетании с пероксидом водорода (3 мМ). Концентрация хлорофилла составляла 10 мкг/мл. Стрелками обозначены моменты включения (↓) и выключения (↑) возбуждающего света. Приведены типичные кинетические кривые, полученные не менее, чем в трех повторностях.

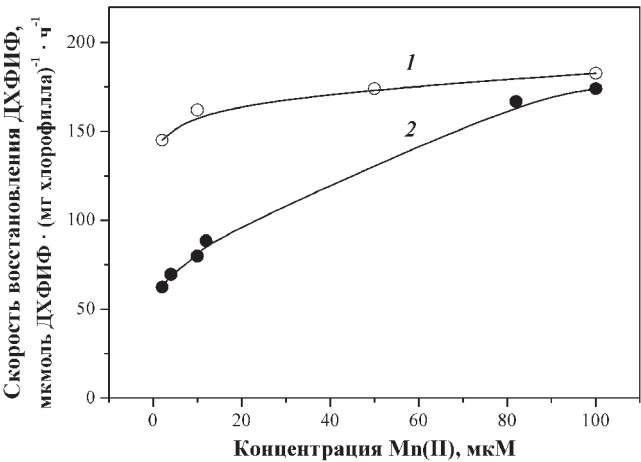


Рис. 2. Влияние цитрата натрия на скорость светоиндуцированного окисления катионов Mn(II) в мембранах ФС2(-Mn). Кривая 1 – зависимость электрон-транспортной активности препаратов ФС2(-Mn) от концентрации марганца в донорной системе [Mn(II) + H₂O₂]. Раствор MnCl₂ добавляли к суспензии ФС2(-Mn) в буфере А (рН 6,5) непосредственно перед измерением активности (концентрация хлорофилла 20 мкг/мл). Концентрация H₂O₂ во всех измерениях составляла 3 мМ. Кривая 2 – раствор MnCl₂ добавляли к суспензии препаратов ФС2(-Mn) в цитратном буфере (рН 3,0) при концентрации хлорофилла 100 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение 3 мин в темноте при комнатной температуре, затем препарат разбавляли в 5 раз буфером А (результатирующий рН ~6,4) и определяли электрон-транспортную активность, измеряя скорость восстановления ДХФИФ (2,6-дихлорофенолиндофенола) при освещении препарата. Перед измерением активности добавляли донорную систему [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H₂O₂], либо только 3 мМ H₂O₂. Концентрация ДХФИФ составляла 40 мкМ, цитрата в буфере при измерении активности – 3 мМ. Данные являются средними арифметическими значений, полученных по крайней мере в трех независимых экспериментах. Стандартная ошибка каждого находится в пределах $\pm 5\%$.

Таблица

Содержание катионов марганца в ФС2 после обработки цитратом	
Образец	Содержание Mn на РЦ
* ФС2 без обработки Ca ²⁺	4,4 $\pm$ 0,2
** ФС2 после обработки раствором Ca ²⁺	3,9 $\pm$ 0,2
*** ФС2 после обработки цитрат-ионами (3 мМ)	3,9 $\pm$ 0,2

Примечание: * – обработка ФС2 мембран раствором CaCl₂ для удаления неспецифически связанных с мембранами катионов Mn(II) не проводилась.

** – содержание катионов Mn в КВК ФС2 определяли согласно методике, описанной в разделе «Материалы и методы», т.е. после обработки раствором Ca²⁺ (50 мМ).

*** – препарат ФС2 перед определением содержания катионов марганца суспендировали в смешанном буфере (20% 15 мМ цитратного буфера, рН 3,0 + 80% буфера А, рН 6,5), рН которого 6,4. Препарат ФС2 (100 мкг хлорофилла/мл) инкубировали 3 мин в темноте при комнатной температуре, затем центрифугировали (16100g $\times$ 15 мин), после чего осадок мембран отмывали буфером А. Содержание катионов марганца в перееосажденной ФС2 определяли с помощью колориметрического метода, описанного в разделе «Материалы и методы», но без обработки раствором CaCl₂.

Таким образом, полученные результаты показывают, что на окисление катионов марганца в препаратах ФС2 без КВК заметное влияние могут оказывать пероксид водорода и органические кислоты. Подобные эффекты следует учитывать при исследовании процесса окисления ФС2 катионов марганца как возможного источника электронов на ранних стадиях эволюции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å // *Nature*. 2011. Vol. 473. N 7345. P. 55–60.
2. Suga M., Akita F., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Nakajima Y., Shimizu T., Yamashita K., Yamamoto M., Ago H., Shen J.-R. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses // *Nature*. 2015. Vol. 517. N 7532. P. 99–103.
3. Johnson J.E., Webb S.M., Thomas K., Ono S., Kirschvink J.L., Fischer W.W. Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110. N 28. P. 11238–11243.
4. Dismukes G.C., Klimov V.V., Baranov S.V., Kozlov Y.N., Dasgupta J., Tyryshkin A. The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 5. P. 2170–2175.
5. Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K. Evolutionary loss of the ability of the photosystem I primary electron donor for the redox interaction with Mn-bicarbonate complexes // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. Vol. 85. N 6. P. 697–708.
6. Kozlov Y.N., Zharmukhamedov S.K., Tikhonov K.G., Dasgupta J., Kazakova A.A., Dismukes G.C., Klimov V.V. Oxidation potentials and electron donation to photosystem II of manganese complexes containing bicarbonate and carboxylate ligands // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004. Vol. 6. N 20. P. 4905–4911.
7. Khorobrykh A.A., Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V. Redox interaction of Mn–bicarbonate complexes with reaction centres of purple bacteria // *Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2008. Vol. 363. N 1494. P. 1245–1251.
8. Terentyev V.V., Shkuropatov A.Y., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Klimov V.V. Investigation of the Redox interaction between Mn-bicarbonate complexes and reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Chromatium minutissimum*, and *Chloroflexus aurantiacus* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2011. Vol. 76. N 12. P. 1360–1366.
9. Khorobrykh A., Dasgupta J., Kolling D.R., Terentyev V., Klimov V.V., Dismukes G.C. Evolutionary origins of the photosynthetic water oxidation cluster: bicarbonate permits Mn^{2+} photo-oxidation by anoxygenic bacterial reaction centers // *ChemBioChem*. 2013. Vol. 14. N 14. P. 1725–1731.
10. 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. Art. ID 6110.
11. Semin B.K., Ghirardi M.L., Seibert M. Blocking of electron donation by Mn (II) to Y_Z^+ following incubation of Mn-depleted photosystem II membranes with Fe (II) in the light // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41. N 18. P. 5854–5864.
12. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 153. N 1. P. 231–234.
13. 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.
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. Semin B.K., Seibert M. A simple colorimetric determination of the manganese content in photosynthetic membranes // *Photosynth. Res.* 2009. Vol. 100. N 1. P. 45–48.
16. Semin B.K., Davletshina L.N., Ivanov I.I., Seibert M., Rubin A.B. Rapid degradation of the tetrameric Mn cluster in illuminated, PsbO-depleted photosystem II preparations // *Biochemistry (Mosc.)*. 2012. Vol. 77. N 2. P. 152–156.
17. Yocum C.F., Yerkes C.T., Blankenship R.E., Sharp R.R., Babcock G.T. Stoichiometry, inhibitor sensitivity, and organization of manganese associated with photosynthetic oxygen evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. Vol. 78. N 12. P. 7507–7511.
18. Kuntzleman T., McCarrick R., Penner-Hahn J., Yocum C. Probing reactive sites within the photosystem II manganese cluster: evidence for separate populations of manganese that differ in redox potential // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004. Vol. 6. N 20. P. 4897–4904.
19. Serrat F.B. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine for the colorimetric determination of manganese in water // *Microchim. Acta*. 1998. Vol. 129. P. 77–80.
20. Xu Q., Bricker T.M. Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II. Two molecules of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. N 36. P. 25816–25821.
21. Blankenship R.E., Hartman H. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis // *Trends Biochem. Sci.* 1998. Vol. 23. N 3. P. 94–97.
22. Boussac A., Picaud M., Etienne A.-L. Effect of potassium iridic chloride on the electron donation by Mn^{2+} to photosystem II particles // *Photochem. Photobiophys.* 1986. Vol. 10. P. 201–211.
23. Inoue H., Wada T. Requirement of manganese for electron donation of hydrogen peroxide in photosystem II reaction center complex // *Plant Cell Physiol.* 1987. Vol. 28. N 5. P. 767–773.
24. Hoganson C.W., Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F. Mn^{2+} reduces Y_Z^+ in manganese-depleted photosystem II preparations // *Photosynth. Res.* 1989. Vol. 22. N 3. P. 285–293.

25. Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca^{2+} -depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // *Photosynth. Res.* 2013. Vol. 117. N 1. P. 385–399.
26. Lovyagina E.R., Loktyushkin A.V., Semin B.K. Effective binding of Tb^{3+} and La^{3+} cations on the donor side of Mn-depleted photosystem II // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2021. Vol. 26. N 1. P. 1–11.
27. Inoué H., Akahori H., Noguchi M. Activation of electron donation from hydrogen peroxide by manganese in non-oxygen evolving photosystem II particles // *Plant Cell Physiol.* 1987. Vol. 28. N 7. P. 1339–1343.
28. Inoué H., Wada T. Requirement of manganese for electron donation of hydrogen peroxide in photosystem II reaction center complex // *Plant Cell Physiol.* 1987. Vol. 28. N. 5. P. 767–773.
29. Kurashov V.N., Lovyagina E.R., Shkolnikov D.Y., Solntsev M.K., Mamedov M.D., Semin B.K. Investigation of the low-affinity oxidation site for exogenous electron donors in the Mn-depleted photosystem II complexes // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2009. Vol. 1787. N 12. P. 1492–1498.
30. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. Data for biochemical research. 3rd Ed. Oxford: Clarendon press, 1989. 592 pp.
31. Ono T., Inoue Y. Discrete extraction of the Ca atom functional for O_2 evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 227. N 2. P. 147–152.

Поступила в редакцию 15.02.2022

После доработки 13.04.2022

Принята в печать 12.05.2022

RESEARCH ARTICLE

Peculiarities of Mn(II) cation oxidation in the photosystem II without oxygen-evolving complex. Evolutionary aspect

E.R. Lovyagina* , L.N. Davletshina , B.K. Semin 

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

*email: elena.lovyagina@gmail.com

One of the main reactions in the process of the light energy transformation in oxygenic organisms is the extraction of electrons from water, which are necessary for the light stage of photosynthesis. The light-dependent oxidation of water is carried out by an oxygen-evolving complex (OEC), the catalytic center of which is the cluster Mn_4CaO_5 . OEC is located in photosystem II (PSII) on the lumen side of thylakoid membrane. The evolutionary origin of the PSII is unclear, as is the origin of the manganese cluster in the OEC. Recently, Johnson et al. (2013) suggested that in the primary PSII in the Archean period, the cluster Mn_4CaO_5 was absent, and PSII oxidized not water, but Mn(II) cations, i.e., manganese cations were the source of electrons. In the presented work, we investigated the possibility of the influence of some environmental factors (citrate and hydrogen peroxide) on the oxidation rate of Mn(II) cations by a PSII that does not contain OEC. We found that citrate inhibit the oxidation of Mn(II) cations binding them but doesn't extract Mn cations from OEC. Hydrogen peroxide, on the contrary, significantly increases the oxidation rate of manganese (from 28 ± 2 to 145 ± 7 μmol 2,6-dichlorophenolindophenol $\text{mg Chl}^{-1} \text{h}^{-1}$ in the presence of H_2O_2). Such effects should be taken into account when investigating the oxidation of manganese cations by the photosystem as a possible source of electrons in the early stages of evolution.

Keywords: evolution of photosystems, photosystem II, oxygen-evolving complex, manganese, citrate, hydrogen peroxide

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

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>

Давлетшина Лира Назиповна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: davlet@biophys.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2702-0891>

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 616-092.19+57.017.3

Влияние острой гипоксии на разных сроках гестации на показатели окислительного стресса у потомства крыс**А.В. Граф^{1,3} , А.А. Байжуманов² , М.В. Маслова¹ , Я.В. Крушинская¹ ,
А.С. Маклакова¹ , Н.А. Соколова¹, А.А. Каменский^{1,*} **

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

³Институт нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий, Московский физико-технический институт, Россия, 123098, г. Москва, ул. Максимова, д. 4

*e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Внутриутробная гипоксия — самый распространенный пренатальный фактор риска, представляющий непосредственную опасность не только для жизни плода, но также для будущей постнатальной жизни организма. Целью настоящего исследования является выявление связи между гипоксией плода и окислительным стрессом, а также оценка значения гестационного возраста и пола для развития окислительного стресса. Беременных крыс подвергали острой гипоксии на 10-е либо 20-е сут беременности, что соответствует первому и второму триместрам беременности у человека. У новорожденных крысят на 2-е сут жизни и у половозрелого потомства обоих полов на 60-е сут жизни проводили оценку состояния антиоксидантной защиты по содержанию небелковых тиолов в крови и гомогенате печени, каталазной и супероксиддисмутазной активности в гомогенате печени, общей антиоксидантной активности и уровню церулоплазмينا в плазме крови, а также по интенсивности перекисного окисления липидов в плазме крови и гомогенате печени. Независимо от срока гестации, на котором потомство перенесло острую гипоксию, у новорожденных крысят зафиксированы многочисленные изменения показателей системы антиоксидантной защиты, свидетельствующие в пользу развития окислительного стресса, что может быть причиной показанных уже для взрослых животных нарушений неврологического и кардиологического характера.

Ключевые слова: прооксидантная и антиоксидантная системы, окислительный стресс, острая пренатальная гипоксия, ТБК-активные продукты, небелковые тиолы, супероксиддисмутаза

Внутриутробная гипоксия — самый распространенный пренатальный фактор риска, определяющий нарушения развития плода и повышающий риск перинатальной и младенческой смертности [1]. Так, гипоксия плода является причиной более 30% неонатальных смертей во всем мире [2]. Одним из путей патогенеза внутриутробной гипоксии, определяющим тяжесть повреждений, является повышенная выработка активных форм кислорода (АФК). АФК необходимы для выполнения ряда клеточных функций, особенно на ранних стадиях эмбриогенеза. Однако антиоксидантная защита (АОЗ) не может противостоять избыточному производству АФК, что приводит к развитию клеточного окислительного стресса. Повреждение ДНК, денатурация белков и перекисное окисление липидов, вызванные АФК, могут нарушать функции плаценты, что приводит к снижению содержания кислорода и питательных веществ у плода [3]. Этот патологический каскад вызывает ограничения роста плода, что часто

коррелирует с аномальным развитием органов, которые могут не поддерживать нормальное функционирование в течение будущей жизни [4]. Другими словами, внутриутробная гипоксия является основной фетального программирования, представляя непосредственную опасность не только для жизни плода, но также для будущей постнатальной жизни. Острая гипоксия во время беременности встречается значительно реже, чем хроническая гипоксия, однако последствия кратковременных эпизодов острой гипоксии, обычно длящихся несколько минут, могут быть даже более серьезными, чем последствия гипоксии хронической. При этом важно учитывать, что в обоих случаях влияние на развитие плода сильно варьирует и зависит, в том числе, от срока гестации, на котором произошла гипоксия [5, 6]. Кроме того, особый интерес представляют гендерные отличия в реакциях на пренатальную гипоксию у половозрелого потомства. Данное исследование направлено на выявление связи между гипоксией плода и окислительным стрессом, а также

оценку значения гестационного возраста и пола для развития окислительного стресса. Беременных крыс подвергали острой гипоксии в период раннего органогенеза, т.е. на 10-е сут внутриутробного развития, или в предродовой период, т.е. на 20-е сут внутриутробного развития. Выбранные сроки пренатального развития крысы соответствуют 3-й и 13–15-й нед. беременности в развитии человека [7, 8]. Вопрос о роли гестационного возраста во время гипоксического воздействия в литературе рассматривают редко, традиционно доклинические и клинические исследования оценивают последствия гипоксии, возникающие в третьем триместре беременности, а также непосредственно перед родами или во время родов. Влияние гипоксии на ранних сроках внутриутробного развития изучено крайне неполно. Однако периоды раннего и интенсивного органогенеза также являются критическими периодами эмбриогенеза, и последствия стрессорного воздействия в это время не только влияют на последующие этапы эмбрионального развития, но и значительно повышают риск возникновения различных нарушений в отдаленные периоды постнатального развития [9, 10]. Понимание зависимости степени развития окислительного стресса у плода от периода гипоксического воздействия позволит определить возможные механизмы, предопределяющие риск заболевания в постнатальном периоде, а также оценить оптимальные стратегии терапевтических воздействий, направленных на снижение вредных последствий окислительного стресса.

Материалы и методы

Эксперименты на животных. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованным в Директивах Европейского Союза 2010/63/EU. Животных содержали при 21 ± 2 °C и относительной влажности $53 \pm 5\%$ с циклом свет/темнота — 12/12 ч (свет включен в 9:00, выключен в 21:00).

Беременных самок крыс линии Wistar (возраст 10–14 нед.; вес 200–230 г на начало эксперимента) подвергали острой гипоксии, как описано ранее [9], на 10-е ($n=3$) или 20-е сут беременности ($n=3$), что соответствует первому и второму триместрам беременности человека. Контрольных животных ($n=4$) гипоксии не подвергали. Мы не наблюдали значимых различий в количестве новорожденных детенышей (9 ± 1) между контрольными и опытными крысами, хотя независимый многолетний физиологический мониторинг показал, что у последних вероятность неблагоприятных исходов беременности выше. В эксперименте использовали потомство самок крыс линии Wistar на 2-е и 60-е сут жизни. Потомство оставалось с матерями до 28-х сут жизни, далее до 40-х сут животных одного помета содержали по 5–6 крыс в клет-

ке (Т/4К 555/4К, 580×375×200 мм), после чего самок и самцов рассаживали по разным клеткам.

Использовали три экспериментальные группы: контроль — потомство контрольных животных; ОПГ(10) и ОПГ(20) — потомство самок, пережившее острую пренатальную гипоксию (ОПГ) на 10-е либо 20-е сут гестации соответственно. Общее количество животных в экспериментальных группах указано в подрисуночных подписях.

Моделирование острой гипобарической гипоксии. Самок крыс подвергали острой гипобарической гипоксии (5% O_2) до первого агонального вдоха в декомпрессионной камере объемом 3,3 л, атмосферное давление снижали вакуумным насосом «Mez Mohelnice» (Чехия) за 1 мин [11]. Время гипоксического воздействия в группах достоверно не различалось и составило $169,6 \pm 53,8$ с и $148,3 \pm 23,9$ с на 10-е и 20-е сут беременности соответственно.

Оценка состояния системы АОЗ. Оценку состояния АОЗ проводили у новорожденных на 2-е, а у половозрелого потомства обоих полов — на 60-е сут постнатального развития.

Получение крови и плазмы крови. Забор проб крови проводили во время декапитации животных. Цельную кровь (с добавленным гепарином, 10 ед./мл) центрифугировали 10 мин при 2000 об./мин и 4 °C (центрифуга Heraeus Labofuge 400R, Thermo Fisher Scientific, США). Плазму отбирали для измерения количества церулоплазмينا, общей антиоксидантной активности плазмы (ОААП), количества активных продуктов — тиобарбитуровой кислоты (ТБК-активных продуктов — ТБК-АП).

Получение 10%-ного гомогената печени. Цельный кусок органа (массой до 250 мг) помещали в раствор калий-фосфатного буфера (0,015 М, pH 7,8) в соотношении 1:9 и гомогенизировали (гомогенизатор Heidolph, Silent Crusher S, Германия) при 4 °C. В полученном гомогенате измеряли активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, общее количество белка, количество небелковых тиолов и ТБК-АП.

Определение общей активности СОД в гомогенате печени. Метод основан на способности биологических образцов подавлять автоокисление адреналина в щелочном буфере, измерение активности проводили при 25 °C. Одна единица активности СОД определяется как ингибирование скорости окисления адреналина на 50%. Изменение поглощения измеряли при 485 нм. Активность выражали в усл. ед./мг белка [12].

Определение каталазной активности в гомогенате печени. Принцип метода основан на том, что каталаза разрушает H_2O_2 . Измеряют уменьшение оптической плотности образца при 240 нм. Одна единица каталазной активности определена как количество фермента, необходимое, чтобы переработать 1 мкмоль H_2O_2 в мин при 37 °C. Количе-

ство израсходованной H_2O_2 /мин вычисляли с учетом коэффициента экстинкции — $46,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность фермента выражали в единицах каталазной активности на грамм общего белка в минуту (кU/г белка).

Определение количества церулоплазмينا. Количество церулоплазмينا определяли по оксидантной активности белка, используя в качестве субстрата окисления ортофенилендиамин, окрашенный продукт реакции измеряли при 492 нм. Концентрацию церулоплазмينا, выраженную в мкг/мл плазмы, определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов церулоплазмينا.

Определение количества небелковых тиолов в крови и гомогенате печени. Метод основан на реакции SH-группировок с реактивом Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)) с образованием окрашенного продукта. Определение оптической плотности проводили при длине волны 412 нм, концентрацию рассчитывали с учетом разведения, молярного коэффициента экстинкции $136000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и пересчитывали на гемоглобин (Гб в крови) или общий белок (в гомогенате печени), выражали в нмоль/мг Гб и нмоль/мг белка соответственно.

Определение ОААП крови. Метод основан на способности антиоксидантов плазмы крови, в основном уратов, участвовать в образовании комплекса восстановленного железа с 2,4,6-трипиридилтриазином с максимумом поглощения при длине волны 593 нм. ОААП определяли по калибровочной прямой с использованием известных концентраций восстановленного железа и выражали в $\text{мкмоль Fe}^{2+}/\text{л}$ плазмы [13].

Определение количества ТБК-АП в плазме крови и гомогенате печени. ТБК-АП появляются в результате взаимодействия конечных продуктов перекисного окисления липидов с 2-тиобарбитуровой кислотой, что позволяет определять их концентрацию по поглощению при 532 нм. Содержание ТБК-АП в крови определяли с учетом разведений и коэффициентом молярной экстинкции комплекса малонового диальдегида с ТБК, $0,156 \text{ мкмоль}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Полученные данные выражали в нмоль/мл плазмы или нмоль/мг белка [14].

Определение общего количества белка в гомогенате печени. Использовали модифицированный метод Лоури для определения небольших количеств белка в биологическом материале с использованием реактива Фолина-Чокальтеу, оптическую плотность измеряли при 650 нм. Концентрацию белка, выраженную в мг/мл , определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов альбумина [14].

Определение уровня гемоглобина в гемолизате крови. При взаимодействии гемоглобина с раствором додецилсульфата натрия происходит его превращение в окисленную низкоспиновую фор-

му — гемихром, имеющую красноватый цвет, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе. Оптическую плотность раствора измеряли при 540 нм. Количество гемоглобина рассчитывали с учетом разведения и молярного коэффициента экстинкции гемихрома при 540 нм, $10,16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [13].

Статистическая обработка. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPad Prism, версия 7.0 (GraphPad Software Inc., США). Сравнения между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием одностороннего дисперсионного анализа (тест Тьюки). Парное сравнение между соответствующими группами самок и самцов проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты

Анализ состояния системы АОЗ крови и печени у новорожденного потомства, пережившего внутриутробную гипоксию. АФК очень реакционно-способны, поэтому для оценки степени окислительного стресса применяли комплексную оценку, позволяющую определить как активность компонентов системы АОЗ (уровень небелковых тиолов в крови и печени, активность каталазы и СОД), так и один из показателей окислительного стресса (уровень ТБК-АП) [13].

Как видно на рис. 1, вне зависимости от срока гестации, на котором потомство перенесло острую гипоксию, на 2-е сут постнатального развития наблюдали все признаки развития окислительного стресса: значимое снижение активности компонентов АОЗ (СОД и каталазы), а также увеличение уровня ТБК-АП в печени. Увеличение количества небелковых тиолов в крови крысят, подвергнутых острой гипоксии на 10-е сут гестации, может быть связано с влиянием гипоксии на систему регуляции эритропоэза [15], что могло привести к циркуляции в крови более молодых эритроцитов, у которых уровень антиоксидантов выше, чем у эритроцитов животных, не подвергнутых гипоксическому воздействию [16].

Анализ состояния системы АОЗ крови и печени у половозрелого потомства обоих полов, пережившего внутриутробную гипоксию. У половозрелого потомства обоих полов, пережившего внутриутробную гипоксию, значимых изменений показателей оксидативного стресса, как и показателей АОЗ, не наблюдали за исключением увеличения уровня церулоплазмينا у самцов группы ОПГ(10) на 30,7%. При этом у самцов по сравнению с самками был зарегистрирован также более низкий уровень активности ряда компонентов АОЗ (ОААП крови и уровня небелковых тиолов в печени) и маркера окислительного стресса ТБК-АП в крови и печени (рис. 2, 3). Наблюдаемые разли-

чия характеризуются повышенной активностью как липоперекисных процессов, так и компонентов АОЗ у самок, что свидетельствует о специфичности метаболических реакций и потенциальном различии между полами в проявлении компенсаторных возможностей организма в физиологических условиях.

Обсуждение

Ранее нами был показан дисбаланс уровней и активности про- и антиоксидантов, вызванный острой гипоксией в период раннего органогенеза и перед родами. Данные нарушения могут служить показателями развития окислительного стресса у беременных самок [17], который в пре- и перинатальных условиях может провоцировать неблагоприятные исходы беременности, а также быть одной из основополагающих причин развития различных заболеваний в дальнейшей жизни, причем появиться они могут уже во взрослом состоянии [18]. Крысы являются незрелорождающимися животными, формирование нервной системы их детенышей завершается примерно на

2-й нед. постнатального развития [19], а 2-е сут после рождения можно соотнести с последними неделями беременности у человека и/или преждевременными родами. Наблюдаемое снижение общей активности СОД на фоне повышенного содержания ТБК-АП и небелковых тиолов у детенышей, переживших острую гипоксию на 10-е сут гестации, так же как направленное снижение каталазной активности и повышенное содержание ТБК-АП у крысят, переживших острый гипоксический стресс на 20-е сут гестации, свидетельствуют о развитии у потомства окислительного стресса. В норме АОЗ матери и плаценты в течение внутриутробного развития, а также доношенного новорожденного в физиологических условиях нейтрализует АФК, что позволяет избежать негативных последствий для здоровья [20]. Повышенная продукция АФК на фоне снижения АОЗ приводит к развитию окислительного стресса, который во время интенсивного органогенеза, сопровождающегося активными процессами деления и дифференцировки клеток, может действовать как тератогенный фактор, вызывая структурные

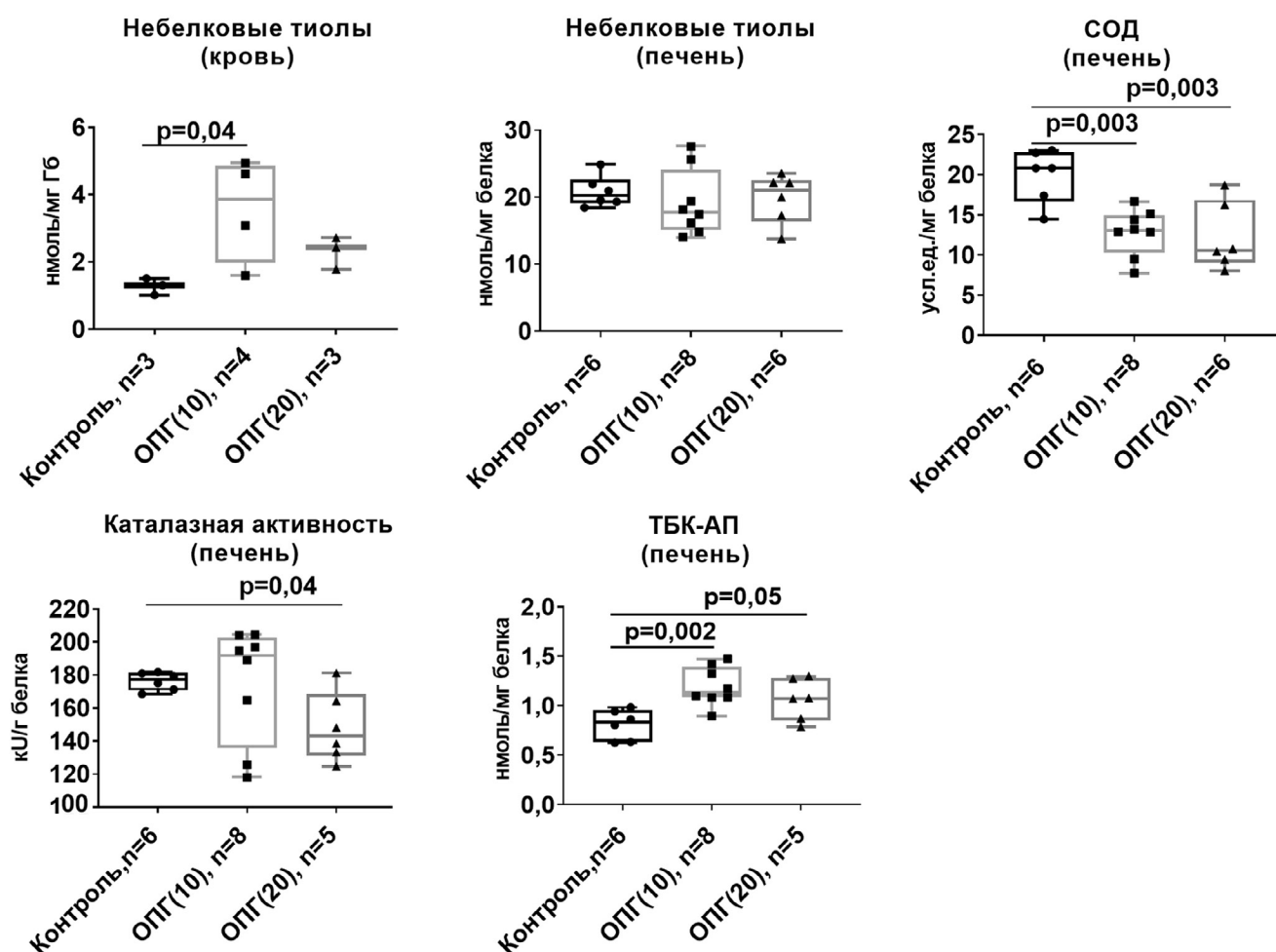


Рис. 1. Показатели окислительного стресса и АОЗ в крови и печени новорожденных детенышей, переживших острую пренатальную гипоксию в разные периоды внутриутробного развития.

Условные обозначения: ОПГ(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сут гестации; ОПГ(20) – острая пренатальная гипоксия на 20-е сут гестации.

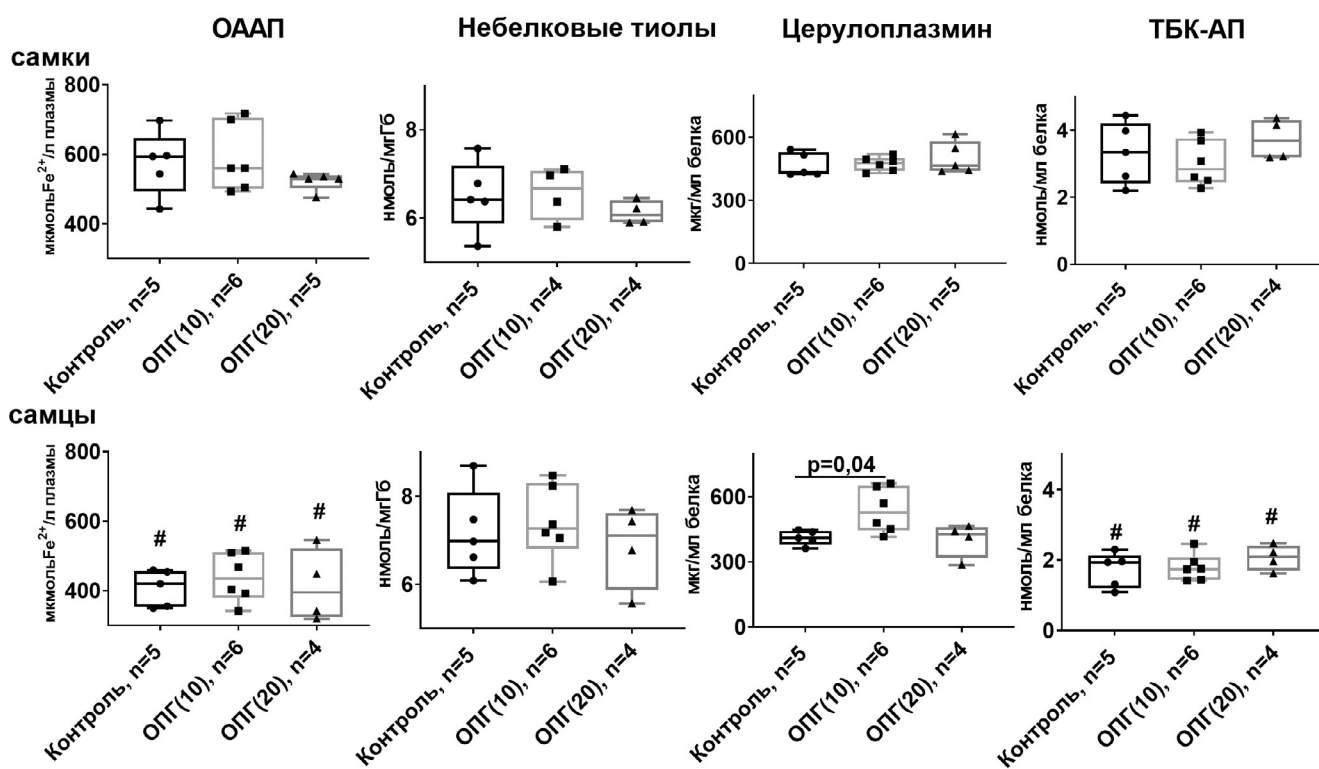


Рис. 2. Показатели окислительного стресса и АОЗ в крови половозрелого потомства, пережившего острую пренатальную гипоксию в разные периоды внутриутробного развития.

Условные обозначения: ОПГ(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сут гестации; ОПГ(20) – острая пренатальная гипоксия на 20-е сут гестации.

– значимые отличия между самками и самцами соответствующих групп, $p \leq 0,05$.

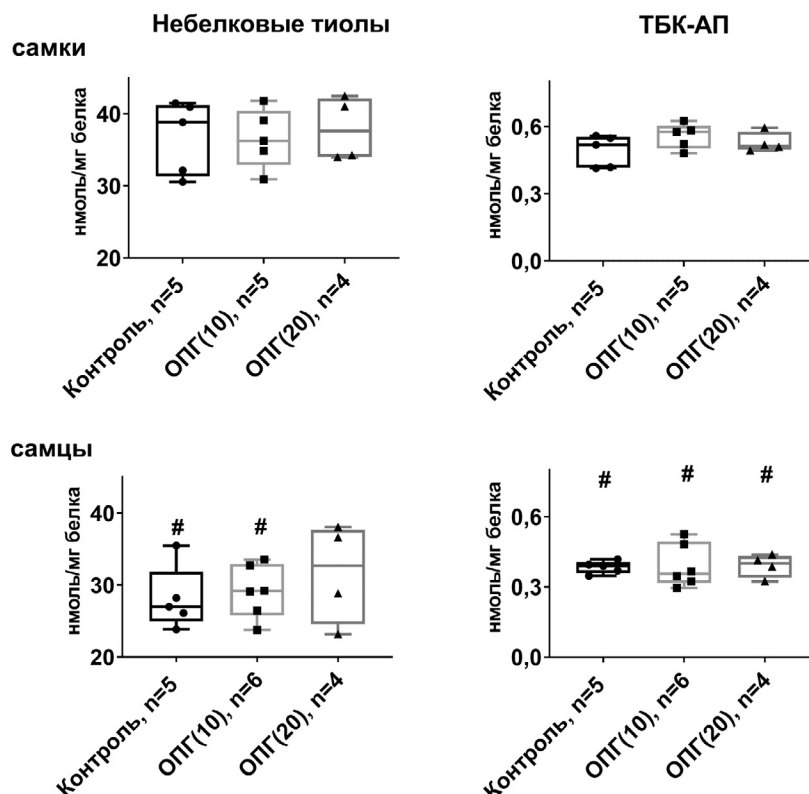


Рис. 3. Уровень небелковых тиолов и ТБК-АП печени у половозрелого потомства, пережившего острую пренатальную гипоксию в разные периоды внутриутробного развития.

Условные обозначения: ОПГ(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сут гестации; ОПГ(20) – острая пренатальная гипоксия на 20-е сут гестации.

– значимые отличия между самками и самцами соответствующих групп, $p \leq 0,05$.

аномалии, потерю клеточной функции или самопроизвольный аборт [20, 21]. Связь между окислительным стрессом и врожденными пороками развития полностью не выяснена; однако окислительный стресс может играть важную роль в развитии врожденных дефектов [22], что соответствует концепции фетального программирования [5]. И хотя точные механизмы эпигенетического программирования плода до конца не изучены, показана корреляция между внутриутробным стрессом и повышенным риском развития у потомства таких заболеваний, как диабет 2-го типа, неврологические расстройства, ожирение, сердечно-сосудистые заболевания [5, 23, 24]. Зарегистрированные нами межполовые различия в активности АОЗ половозрелого потомства согласуются как с экспериментальными данными, демонстрирующими более высокую активность различных антиоксидантных систем у самок в большинстве органов [25, 26], так и с клиническими данными, свидетельствующими о более высоком уровне окислительного стресса у мужчин по сравнению с женщинами репродуктивного периода [27]. Более высокий риск развития окислительного стресса может быть одним из факторов в патогенезе развития многих заболеваний у мужчин, в первую очередь сердечно-сосудистых [28, 29]. В качестве первопричины таких гендерных различий выступают, вероятно, антиоксидантные свойства эстрогена, что доказывается, в частности, тем, что в период постменопаузы у крыс после кастрации

межполовые различия в активности компонентов АОЗ нивелируются [28, 30].

Ранее нами было показано, что однократная острая гипоксия на 10-е и 20-е сут гестации приводит к развитию многочисленных нарушений неврологического и кардиологического характера у взрослого потомства, которые, вероятно, могут быть обусловлены развитием окислительного стресса во внутриутробный и ранний постнатальный периоды. В пользу этого свидетельствует и наблюдаемый у половозрелых самцов группы ОПГ(10) повышенный уровень церулоплазмينا на фоне показанного ранее увеличения активности симпатического контура в регуляции сердечного ритма [9]. По клиническим данным, эти изменения могут быть потенциальными маркерами повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний [31], первопричина развития которых, возможно, обусловлена пренатальным стрессом, пережитым в период раннего органогенеза.

Работа выполнена в рамках научных проектов государственного задания МГУ №121032300071-8 и № 121032500076-1, а также при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kingdom J.C.P., Kaufmann P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia // *Placenta*. 1997. Vol. 18. N 8. P. 613–621.
2. Moshiro R., Mdoe P., Perlman J.M. A Global view of neonatal asphyxia and resuscitation // *Front. Pediatr.* 2019. Vol. 7: 489.
3. Fisher J.J., Bartho L.A., Perkins A.V., Holland O.J. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2020. Vol. 47. N 1. P 176–184.
4. Meyer K., Zhang L. Fetal programming of cardiac function and disease // *Reprod. Sci.* 2007. Vol. 14. N 3. P. 209–216.
5. Giussani D.A., Davidge S.T. Developmental programming of cardiovascular disease by prenatal hypoxia // *J. Dev. Orig. Health Dis.* 2013. Vol. 4. N 5. P. 328–337.
6. Giussani D.A. The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms // *J. Physiol.* 2016. Vol. 594. N 5. P. 1215–1230.
7. Chan L.Y., Chiu P.Y., Siu S.S.N., Lau T.K. A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model // *Hum. Reprod.* 2001 Vol. 16. N 11. P. 2390–2393.
8. Ross E.J., Graham D.L., Money K.M., Stanwood G.D. Developmental consequences of fetal exposure to drugs: what we know and what we still must learn // *Neuropsychopharmacology*. 2015. Vol. 40. N 1. P. 61–87.
9. Graf A.V., Maslova M.V., Artiukhov A.V., Ksenofontov A.L., Aleshin V.A., Bunik V.I. Acute prenatal hypoxia in rats affects physiology and brain metabolism in the offspring, dependent on sex and gestational age // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. N 5: 2579.
10. Huang L., Chen X., Dasgupta C., Chen W., Song R., Wang C., Zhanget L. Foetal hypoxia impacts methylome and transcriptome in developmental programming of heart disease // *Cardiovasc. Res.* 2019. Vol. 115. N 8. P. 1306–1319.
11. Graf A., Trofimova L., Ksenofontov A., Baratova L., Bunik V. Hypoxic adaptation of mitochondrial metabolism in rat cerebellum decreases in pregnancy // *Cells*. 2020. Vol. 9. N 1: 139.
12. Zhidkova T.V., Proskurnina E.V., Parfenov E.A., Vladimirov Y.A. Determination of superoxide dismutase and SOD-mimetic activities by a chemical system: Co₂/H₂O₂/lucigenin // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. Vol. 401. N 1. P. 381–386.
13. Pankratova M.S., Baizhumanov A.A., Yusipovich A.I., Faassen M., Shiryayeva T.Yu., Peterkova V.A., Kovalenko S.S., Kazakova T.A., Maksimov G.V. Imbalance in the blood antioxidant system in growth hormone-deficient children before and after 1 year of recombinant growth hormone therapy // *PeerJ*. 2015. Vol. 3: e1055.
14. Матюлько И.С., Байжуманов А.А., Хиразова Е.Э., Маслова М.В. Влияние различных режимов пи-

твовой депривации на систему антиоксидантной защиты крови и поведенческую активность крыс // Журн. мед.-биол. исслед. 2018. Т. 6. № 3. Р. 254–261.

15. Haase V.H. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors // *Blood Rev.* 2013. Vol. 27. N 1. P. 41–53.

16. Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? // *Br. J. Pharmacol.* 2004. Vol. 142. N 2. P. 231–255.

17. Graf A.V., Baizhumanov A.A., Maslova M.V., Krushinskaya Ya.V., Maklakova A.S., Sokolova N.A., Kamensky A.A. The antioxidant system activity during normal pregnancy and pregnancy followed by hypoxic stress // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2021. Vol. 76. N 3. P. 104–110.

18. Von Essen C., Rydenhag B., Mozzi R., van Gelder N., Hamberger A. High levels of glycine and serine as a cause of the seizure symptoms of cavernous angiomas? // *J. Neurochem.* 2002. Vol. 67. N 1. P. 260–264.

19. Bayer S.A., Altman J., Russo R.J., Zhang X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat // *Neurotoxicology.* 1993. Vol. 14. N 1. P. 83–144.

20. Laforgia N., Di Mauro A., Favia Guarnieri G., Varvara D., De Cosmo L., Panza R., Capozza M., Baldassarre M.E., Resta N. The role of oxidative stress in the pathomechanism of congenital malformations // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. Vol. 2018: 7404082.

21. Wu F., Tian F.-J., Lin Y. Oxidative stress in placenta: health and diseases // *Biomed. Res. Int.* 2015. Vol. 2015: 293271.

22. Silvestro S., Calcaterra V., Pelizzo G., Bramanti P., Mazzon E. Prenatal hypoxia and placental oxidative stress: insights from animal models to clinical evidences // *Antioxidants (Basel).* 2020. Vol. 9. N 5: 414.

23. Chiera M., Cerritelli F., Casini A., Barsotti N., Boschiero D., Caviglioli F., Corti C.G., Manzotti A. Heart rate variability in the perinatal period: a critical and conceptual review // *Front. Neurosci.* 2020. Vol. 14: 561186.

24. Ghulmiyyah L.M., Costantine M.M., Yin H., Tamayo E., Clark S.M., Hankins G.D.V., Saade G.R.,

Longo M. The role of oxidative stress in the developmental origin of adult hypertension // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2011. Vol. 205. N 2. P. 155.e7–155.e11.

25. Bureau I., Gueux E., Mazur A., Rock E., Rousel A.-M., Rayssiguier Y. Female rats are protected against oxidative stress during copper deficiency // *J. Am. Coll. Nutr.* 2003. Vol. 22. N 3. P. 239–246.

26. Katalinic V., Modun D., Music I., Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays // *Comp. Biochem. Physiol. Part. C. Toxicol. Pharmacol.* 2005. Vol. 40. N 1. P. 47–52.

27. Kander M.C., Cui Y., Liu Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. Vol. 21. N 5. P. 1024–1032.

28. Barp J., Araújo A.S.R., Fernandes T.R.G., Rigatto K.V., Llesuy S., Belló-Klein A., Singal A. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002. Vol. 35. N 9. P. 1075–1081.

29. Ide T., Tsutsui H., Ohashi N., Hayashidani S., Suematsu N., Tsuchihashi M., Tamai H., Takeshita A. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. Vol. 22. N 3. P. 438–442.

30. Vassalle C., Sciarrino R., Bianchi S., Battaglia D., Mercuri A., Maffei S. Sex-related differences in association of oxidative stress status with coronary artery disease // *Fertil. Steril.* 2012. Vol. 97. N 2. P. 414–419.

31. Dadu R.T., Dodge R., Nambi V., Virani S.S., Hoo-geveen R.C., Smith N.L., Chen F., Pankow J.S., Guild C., Tang W.H.W., Boerwinkle E., Hazen S.L., Ballantyne C.M. Ceruloplasmin and heart failure in the atherosclerosis risk in communities study // *Circ. Heart Fail.* 2013. Vol. 6. N 5. P. 936–943.

Поступила в редакцию 12.03.2022

После доработки 26.04.2022

Принята в печать 20.05.2022

RESEARCH ARTICLE

The effect of acute hypoxia at different gestation periods on markers of oxidative stress in rat's offspring

A.V. Graf^{1,3} , A.A. Baizhumanov² , M.V. Maslova¹ , Ya.V. Krushinskaya¹ ,
A.S. Maklakova¹ , N.A. Sokolova¹, A.A. Kamensky¹ 

¹Human and Animal Physiology Department and ²Biophysics Department, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, 119234, Moscow, Russia;

³Faculty of Nano-, Bio-, Informational, Cognitive and Socio-humanistic Sciences and Technologies, Moscow Institute of Physics and Technology, 4 Maximova str., 123098, Moscow, Russia

*e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Intrauterine hypoxia is the most common prenatal risk factor providing the direct danger not only to the fetus, but also to the future postnatal life. The aim of this study is to identify the relationship between fetal hypoxia and oxidative stress, as well as to assess the significance of gestational age and gender for the development of oxidative stress. Pregnant rats were subjected to acute hypoxia on the 10th or 20th day of pregnancy, which correspond to the first and the

second trimesters of human pregnancy, respectively. In newborn rats on the 2nd day of postnatal development and in mature offspring of both sexes on the 60th day of life the state of antioxidant protection was assessed by the content of non-protein thiols in blood and liver homogenate, catalase and superoxide dismutase activity in the liver homogenate, total antioxidant activity and the level of ceruloplasmin of blood plasma, as well as by the intensity of lipid peroxidation in blood plasma and liver homogenate. Regardless of the gestation period corresponding to acute hypoxia in offspring, noticeable changes of antioxidant protection system parameters were recorded in newborns, indicating the development of oxidative stress, responsible for neurological and cardiological disorders already shown for adult animals.

Keywords: *prooxidant and antioxidant systems, oxidative stress, acute prenatal hypoxia, TBA-active products, non-protein thiols, superoxide dismutase*

Funding: The study was performed under the state assignment of Moscow State University, project numbers №121032300071-8 and № 121032500076-1, as well as by the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University «Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology».

Сведения об авторах

Граф Анастасия Викторовна — канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: nastjushka@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3579-8089>

Байжуманов Адиль Ануарович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-03; e-mail: baizhumanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9737-4516>

Маслова Мария Вадимовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: maslova_masha@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8499-5433>

Крушинская Янина Валерьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: yanyakr@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7787-1435>

Маклакова Анастасия Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: a_maklakova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8508-6231>

Соколова Наталия Александровна — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: 1945@mail.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6496-0527>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

**Роль изоформ протеинкиназы C
в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек****Н.В. Воробьева^{1, *} , С.С. Вахлярская², Б.В. Черняк³**

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

²Отделение клинической иммунологии и ревматологии, Российская детская клиническая больница, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 119571, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Нейтрофилы высвобождают деконденсированный ядерный хроматин, или нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) в ответ на большое количество разнообразных физиологических и фармакологических стимулов. Однако, кроме защиты хозяина от инфекции, NET играют важную роль в патогенезе различных аутоиммунных, воспалительных и злокачественных заболеваний. В этой связи понимание молекулярных механизмов образования NET, ведущее, как правило, к гибели нейтрофилов (НЕТоз), крайне важно для обеспечения контроля последствий aberrантного или избыточного выброса хроматина. Протеинкиназа C (PKC, protein kinase C) представляет собой серин/треониновую киназу, которая участвует в разнообразных функциях нейтрофилов, однако ее участие в НЕТозе изучено недостаточно. Поскольку у нейтрофилов человека описано пять изоформ PKC (α , β I, β II, δ и ζ), в нашей работе был изучен их вклад в НЕТоз и окислительный взрыв с использованием ингибиторного анализа. Используя специфические ингибиторы изоформ PKC, мы показали, что PKC β , PKC δ и PKC ζ участвуют в окислительном взрыве и НЕТозе, индуцированном кальциевым ионофором A23187, тогда как PKC β участвует в окислительном взрыве и НЕТозе при активации клеток миметиком диацилглицерола фобол-12-миристан-13-ацетатом.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, нейтрофильные внеклеточные ловушки, НЕТоз, окислительный взрыв, изоформы протеинкиназы C

Нейтрофилы являются наиболее многочисленными лейкоцитами крови и первой линией защиты хозяина от патогенов. Являясь профессиональными фагоцитами, нейтрофилы содержат антимикробные ферменты в гранулах и отвечают в очагах воспаления за такие эффекторные функции, как фагоцитоз и дегрануляция, а также вызывают окислительный взрыв, который состоит в интенсивном образовании активных форм кислорода (АФК) при активации ферментного комплекса НАДФН-оксидазы. Новой эффекторной функцией нейтрофилов, впервые обнаруженной Такей и соавт. [1] и всесторонне исследованной в лаборатории Циклинского [2], является образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, от Neutrophil Extracellular Trap). NET состоят из деконденсированного хроматина, покрытого гистонами, антимикробными ферментами и катионными пептидами гранул, а также цитозольными белками [2, 3]. Процесс образования NET, веду-

щий к программируемой гибели клеток, был назван НЕТозом [4].

Впоследствии стало ясно, что, помимо защитной функции, NET играют существенную роль в патогенезе большого количества аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний [5–8]. В связи с этим понимание молекулярных механизмов НЕТоза важно для обеспечения контроля последствий нерегулируемого или избыточного образования NET.

Классический НЕТоз представляет собой многостадийный процесс, включающий активацию, образование АФК НАДФН-оксидазой, диссоциацию под действием пероксида водорода «азуром», белковых комплексов, расположенных в мембранах азуромных гранул [9], выход из азурома сериновых протеаз (нейтрофильной эластазы – НЭ, катепсина G и азуроцидина) и миелопероксидазы (МПО) в цитоплазму, миграцию НЭ и МПО в ядро, где вместе с пептидил-аргининде-

заминазой 4 (PAD4, peptidylarginine deiminase-4), цитруллинирующей гистоны, они способствуют деконденсации ядерного хроматина [2].

Образование NET может быть индуцировано большим количеством разнообразных физиологических стимулов, таких как бактерии, грибы, простейшие, вирусы и продукты клеточной стенки бактерий (липополисахариды). НЕТоз также могут индуцировать антитела [10], цитокины (IL-8, IL-1 β , TNF- α) [3, 11], микрокристаллы [12], кальциевые и калиевые [13] ионофоры, а также фармакологические стимулы – например, фторболовые эфиры.

Большинство этих стимулов активирует НЕТоз, зависящий от АФК, генерируемых многокомпонентным ферментным комплексом НАДФН-оксидазой. НАДФН-оксидаза активируется после сборки четырех цитозольных субъединиц (p47phox, p67phox, p40phox и Rac2) с трансмембранными субъединицами (gp91phox и p22phox), и его работа тонко регулируется фосфорилированием протеинкиназой C [14].

В соответствии с общепринятой моделью активация РКС происходит после ее транслокации из цитозоля в мембрану. После активации РКС фосфорилирует остатки серина и треонина на субъединицах НАДФН-оксидазы. Семейство РКС млекопитающих включает 12 изоформ, разделенных на три подсемейства в соответствии с их доменной структурой и регуляцией [15]. Классические изоформы РКС (сРКС) включают РКС α , РКС β I, РКС β II и РКС γ и активируются при связывании с фосфатидилсерином, диацилглицеролом (ДАГ) и Ca²⁺, а также с миметиком ДАГ, ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат). Новые изоформы РКС (нРКС) включают РКС δ , РКС ϵ , РКС η и РКС θ . Эти киназы нечувствительны к кальцию и активируются ДАГ и ФМА. Атипичные РКС (аРКС) представлены изоформами РКС ζ и РКС τ / λ , они нечувствительны к кальцию и не отвечают на ФМА и ДАГ, однако активируются фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой-1, фосфатидилинозитол-3-киназой и ее продуктом фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом. Как было показано в многочисленных исследованиях, нейтрофилы человека содержат пять изоформ РКС (α , β I, β II, δ и ζ) [16, 17].

Ранее было установлено, что изоформы РКС участвуют в различных функциях нейтрофилов, таких как окислительный взрыв, адгезия, дегрануляция, фагоцитоз и апоптоз [18]. Однако мало что известно о том, какие изоформы РКС участвуют в НЕТозе, активируемом различными физиологическими и фармакологическими стимулами. В нашем исследовании было всесторонне изучено влияние классических, новых и атипичных изоформ РКС на НЕТоз нейтрофилов человека, активированных ионофором кальция A23187 и фторболовым эфиром ФМА.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, хелеритрин (ингибитор всех изоформ РКС), роттлерин (ингибитор РКС δ), LY333531 (ингибитор РКС β), миристилированный псевдосубстрат РКС ζ (ингибитор РКС ζ), верапамил, люминол были приобретены у Sigma-Aldrich (США). Краситель SYBR Green и смола ProLong Gold были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека.

Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и были одобрены локальным комитетом по этике. Периферическую кровь здоровых доноров или пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ $\times$ мл⁻¹ крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугауе (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре как описано ранее [19]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстрате. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2% NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали физиологический солевой состав путем добавления гипертонического хлорида натрия (1,6% NaCl). Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI 1640 с добавлением 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла более 99%, что определяли по исключению 0,1% трипанового синего. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4 °C перед экспериментом.

Оценка люминолзависимой хемилюминесценции.

Люминолзависимую хемилюминесценцию использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных) как описано ранее [20].

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET.

Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого свежely выделенные нейтрофилы (2×10^5 кл/мл) в ПКС с 1% ЭТС адгезировали на круглых покровных стеклах, находящихся в 24-луночном планшете в объеме 500 мкл, в течение 30 мин при 37 °C. Нейтрофилы инкубировали в лунках с одним из ингибиторов РКС в течение 30 мин при 37 °C и 5% CO₂. Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции НЕТоза клетки фиксировали в лунках в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Препараты погружали в SYBR Green, разведенный в PBS в соотношении 1:10000

в соответствии с рекомендацией производителя, и окрашивали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения, оценивали процент НЕТоза в нескольких полях зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони для оценки различий между группами. Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистически значимые значения p указаны на графиках: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Протеинкиназа С участвует в окислительном взрыве и НЕТозе, индуцированными различными стимулами. Чтобы выяснить, зависит ли НЕТоз нейтрофилов человека, активированный А23187 и ФМА, от РКС, был применен специфический ингибитор всех изоформ РКС, хелеритрин. Действие хелеритрина также оценивали на модели окислительного взрыва, индуцированного А23187 и ФМА, методом регистрации люминолзависимой хемилюминесценции.

На рис. 1 (А, Б) можно видеть, что инкубация нейтрофилов с хелеритрином в возрастающих концентрациях приводила к значительному и дозозависимому подавлению окислительного взрыва, индуцированного обоими стимулами. НЕТоз, стимулированный А23187 и ФМА, также дозозависимо подавлялся хелеритрином (рис. 1, В, Г и рис. Прилож.1А), что указывает на его зависимость от активации РКС при обоих способах стимуляции.

Мы предположили, что РКС, помимо субъединиц НАДФН-оксидазы (окислительный взрыв), может фосфорилировать некоторые другие субстраты, играющие важную роль в активации НЕТоза. Для проверки этого предположения мы использовали нейтрофилы, выделенные из крови больных ХГБ, имеющих мутации, полностью инактивирующие НАДФН-оксидазу. Такие нейтрофилы не способны генерировать оксидаза-зависимые АФК, а также не образуют NET в ответ на многие стимулы, включая ФМА (рис. Прилож.1Б), однако образуют NET в ответ на А23187 (2 мкМ). Инкубация нейтрофилов больных ХГБ в присутствии хелеритрина в течение 30 мин приводила к значительному подавлению НЕТоза (рис.1, Д и рис. Прилож.1Б), что указывало на участие в нем дополнительных субстратов РКС.

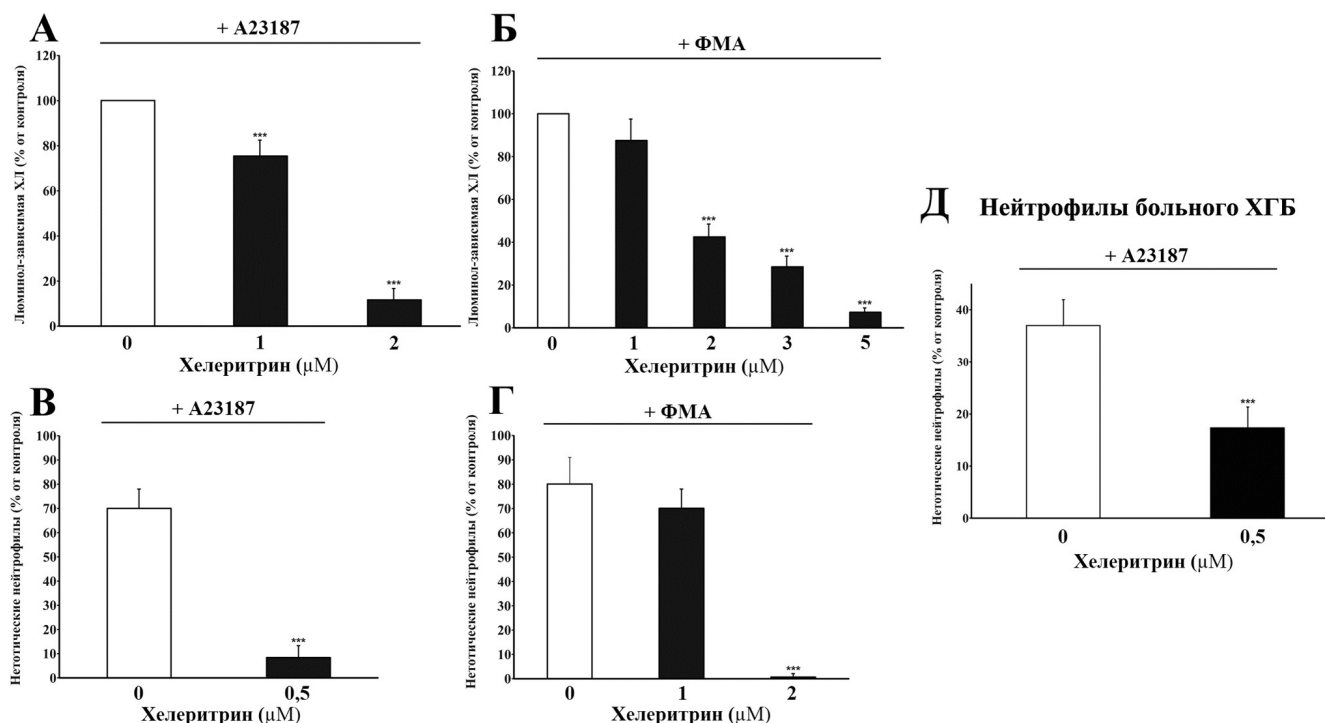


Рис. 1. Оценка участия протеинкиназы С в окислительном взрыве и НЕТозе нейтрофилов человека.

Свежевыделенные нейтрофилы человека инкубировали в присутствии специфического ингибитора РКС хелеритрина в течение 30 мин. Окислительный взрыв индуцировали 2 мкМ А23187 (А) или 30 нМ ФМА (Б). Продукцию АФК рассчитывали как площадь под кривыми люминолзависимой хемилюминесценции и выражали в процентах от контроля (контроль, 100% – стимулированные нейтрофилы).

Для оценки НЕТоза нейтрофилы здоровых доноров предварительно инкубировали на покровных стеклах с хелеритрином в течение 30 мин. Образование NET индуцировали 2 мкМ А23187 (В) или 30 нМ ФМА (Г) в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали SYBR Green для визуализации хроматина; $n = 5$; *** $p < 0,001$.

(Д) Нейтрофилы, выделенные из крови больных ХГБ, инкубировали в присутствии хелеритрина (0,5 мкМ) в течение 30 мин. Образование NET индуцировали 2 мкМ А23187 в течение 4 ч; $n = 3$; *** $p < 0,001$.

Таким образом, наши результаты подтвердили, что РКС участвует в НАДФН-оксидаза-зависимом окислительном взрыве, индуцированном A23187 и ФМА. Кроме того, процесс образования NET зависит не только от НАДФН-оксидазы, но и от РКС-зависимого фосфорилирования других неизвестных мишеней.

Роль различных изоформ РКС в окислительном взрыве и НЕТозе. Нам было интересно выяснить, какие изоформы РКС участвуют в НЕТозе, стимулированном A23187 и ФМА, поскольку ранее были получены противоречивые данные [21, 22]. Учитывая, что в нейтрофилах человека обнаружено всего пять изоформ РКС (α , β I, β II, δ и ζ), причем РКС α содержится в минорных количествах [23], мы использовали селективные ингибиторы РКС β (LY333531), РКС δ (роттлерин) и РКС ζ (псевдосубстрат РКС ζ).

Эффекты ингибиторов были исследованы на модели окислительного взрыва, индуцированного A23187 и ФМА. На рис. 2 (А, Б) можно видеть, что ингибиторы РКС β и РКС δ подавляли A23187-индуцированный окислительный взрыв эффективно и дозозависимым способом (подавление ингибитором РКС ζ не показано). Это указывает на то, что все три изоформы РКС участвуют в фосфорилировании субъединиц НАДФН-оксидазы. Однако в случае стимуляции ФМА только ингибиторы РКС β и РКС δ подавляли окислительный взрыв (рис. 2, В, Г), в то время как ингибитор изоформы РКС ζ был неэффективен (не показано). Этот результат согласуется с тем, что изоформа РКС ζ не чувствительна к ДАГ.

Действие ингибиторов РКС было исследовано при стимуляции НЕТоза как A23187, так и ФМА. Как показано на рис. 2 (Д, Е), ингибиторы изоформ РКС β и РКС ζ эффективно и дозозависимо подавляли A23187-индуцированный НЕТоз, что совпадало с ингибированием окислительного взрыва. Однако ингибитор РКС δ роттлерин, к нашему большому удивлению, был абсолютно неэффективен при использовании в широком диапазоне концентраций (не показано). В случае ФМА-стимулированного НЕТоза только ингибитор изоформы РКС β LY333531 оказывал на него подавляющее действие (рис. 2, Ж), в то время как ингибитор РКС ζ и роттлерин были неэффективны (не показано).

Таким образом, из полученных результатов видно, что хотя роттлерин подавлял окислительный взрыв, индуцированный A23187 и ФМА, НЕТоз в этих условиях не был подавлен. Мы можем объяснить это явление остаточной функцией НАДФН-оксидазы в случае ФМА-индуцированного НЕТоза и образованием митохондриальных АФК в случае A23187-индуцированного НЕТоза, как это происходит в нейтрофилах больных ХГБ [24].

Нам также было интересно выяснить, участвуют ли изоформы РКС (β , δ и ζ) в фосфорилировании других компонентов нетотического каскада

помимо НАДФН-оксидазы. Для этого мы исследовали НЕТоз, индуцированный A23187, в нейтрофилах больных ХГБ. Как показано на рис. 2 (З) и рис. Прилож.2, ингибиторы РКС β , РКС δ и РКС ζ подавляли A23187-индуцированный НЕТоз в нейтрофилах больных ХГБ. Таким образом, все три изоформы РКС участвуют в фосфорилировании иных мишеней, кроме субъединиц НАДФН-оксидазы, необходимых для образования NET.

Плейотропное действие роттлерина в нейтрофилах человека. В предыдущем разделе нашего исследования мы получили противоречивые данные о влиянии роттлерина на различные эффекторные функции нейтрофилов. С одной стороны, роттлерин ингибировал A23187- и ФМА-индуцированный окислительный взрыв, а с другой — не оказывал какого-либо действия на НЕТоз. Кроме того, роттлерин подавлял A23187-индуцированный НЕТоз в нейтрофилах больных ХГБ. Объяснение этих эффектов, возможно, связано с тем, что роттлерин, помимо ингибирования РКС δ , оказывает плейотропное действие на различные клетки [25].

Известно, что почти все иммунные реакции нейтрофилов, включая окислительный взрыв и НЕТоз, на определенной стадии требуют повышения уровня цитоплазматического Ca^{2+} . Нейтрофилы как невозбудимые клетки используют для генерации кальциевых сигналов депо-управляемые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны [26]. Однако, как недавно стало известно, в нейтрофилах имеются также потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCC) L-типа [27], больше характерные для возбудимых клеток. На модели хрусталика глаза мышей было показано, что роттлерин является агонистом кальциевых каналов L-типа [28].

Мы предположили, что роттлерин способствовал открытию этих каналов и повышению концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , компенсируя его действие как ингибитора РКС δ , снижающего активность НАДФН-оксидазы. Для доказательства нашей гипотезы мы использовали A23187 и ФМА в концентрациях, которые вызывали слабый НЕТоз (рис. 3). Добавление роттлерина на фоне таких доз стимуляторов вызывало дозозависимое повышение НЕТоза (рис. 3, А, Б). Чтобы подтвердить, что роттлерин усиливает НЕТоз, действуя на VGCC L-типа, мы использовали хорошо известный антагонист этих каналов, верапамил. На рис. 3 (В, Г) и рис. Прилож.3 видно, что стимуляция как A23187-, так и ФМА-индуцированного НЕТоза под действием роттлерина была подавлена верапамилом. Интересно, что верапамил не только компенсировал стимулирующее действие роттлерина, но и ингибировал НЕТоз, индуцированный A23187 и ФМА. Эти данные указывают на то, что как A23187, так и ФМА могут стимулировать открытие VGCC L-типа, что вносит существенный вклад в индукцию НЕТоза.

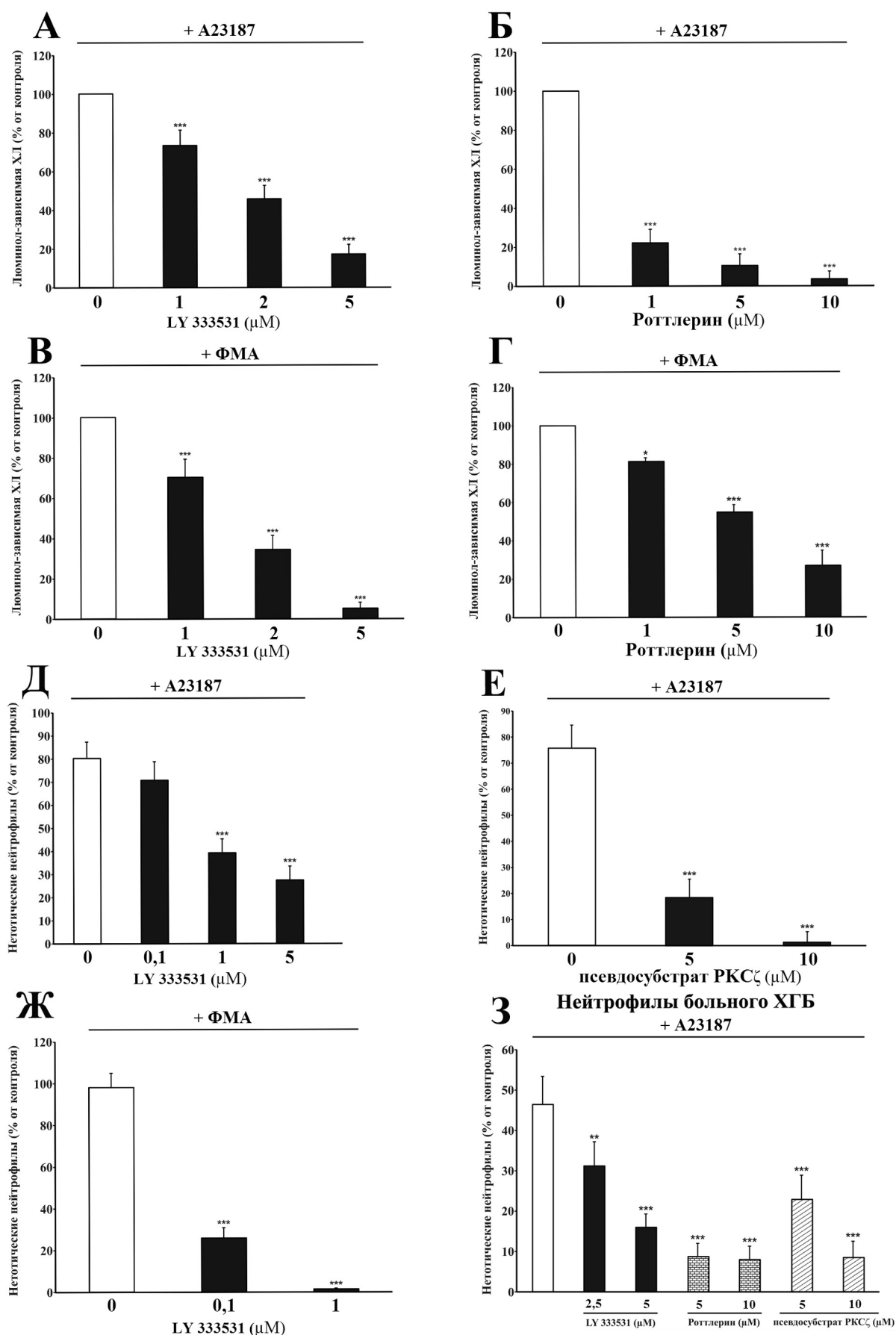


Рис. 2. Оценка участия изоформ РКС в окислительном взрыве и НЕТОзе, индуцированных различными стимулами. Нейтрофилы инкубировали в присутствии селективных ингибиторов изоформ РКС LY333531 (ингибитор РКСβ) (А, В, Д, Ж, З), ротглерина (ингибитор РКСδ) (Б, Г, З) или псевдосубстрата РКСζ (ингибитор РКСζ) (Е, З) в течение 30 мин. Окислительный взрыв и НЕТОз индуцировали и анализировали как указано на рис. 1; n = 3; * p < 0,05; *** p < 0,001.

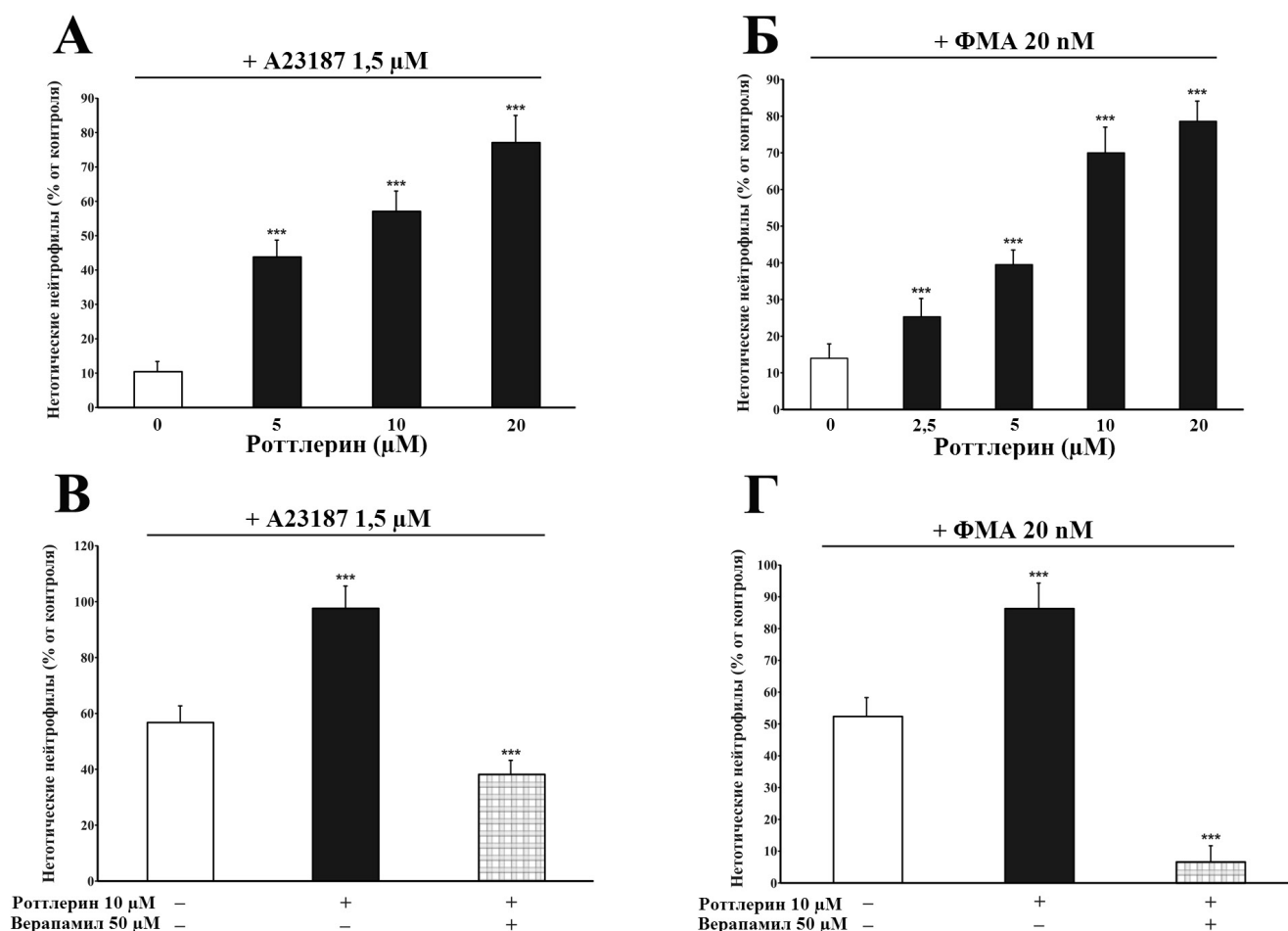


Рис. 3. Действие роттлерина на НЕТОз, индуцированный стимуляторами в низких дозах

(А, Б) Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии роттлерина в повышающихся концентрациях, далее проводили стимуляцию НЕТОза А23187 (1,5 мкМ) или ФМА (20 нМ) в низких дозах в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно.

(В, Г) Нейтрофилы инкубировали в присутствии 50 мкМ верапамила в течение 10 мин, далее добавляли 10 мкМ роттлерина и продолжали инкубацию в течение 30 мин. НЕТОз индуцировали 1,5 мкМ А23187 или 20 нМ РМА в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Клетки окрашивали и анализировали как указано на рис. 1; n = 3; *** p < 0,001.

В предварительных экспериментах мы показали, что роттлерин не вызывает НЕТОз в неактивированных нейтрофилах (данные не представлены). Это позволило предположить, что роттлерин действует как агонист VGCC L-типа лишь после деполяризации мембраны (которая сопровождается активацию нейтрофилов), как это происходит в возбудимых клетках. Деполяризация мембраны нейтрофилов возникает при активации НАДФН-оксидазы благодаря ее электрогенной функции [26]. В нейтрофилах больных ХГБ деполяризация мембраны не происходит, что предотвращает открытие VGCC L-типа под действием роттлерина, и в отсутствие компенсаторного эффекта роттлерин подавляет НЕТОз как ингибитор РКСδ.

Таким образом, наши результаты показали, что РКСδ критически важна для активации НЕТОза, по крайней мере, в нейтрофилах больных ХГБ. Вместе с тем полученные результаты не позволяют оценить роль РКСδ в НЕТОзе нейтрофилов здоровых доноров, поскольку ингибитор

РКСδ роттлерин является также агонистом VGCC L-типа и стимулирует НЕТОз, компенсируя возможный ингибиторный эффект.

Таким образом, в нашей работе было впервые показано, что кальциевый ионофор А23187 индуцирует окислительный взрыв и НЕТОз при участии классических (РКСβ), новых (РКСδ) и атипичных (РКСζ) изоформ РКС (рис. 2, 3). Наши результаты показали, что миметик ДАГ, ФМА, стимулировал окислительный взрыв при участии РКСβ и РКСδ (рис. 2), в то время как для индукции НЕТОза доказано лишь участие РКСβ.

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярные и клеточные основы иммунитета» (проект 21-1-21, номер ЦИТИС 121042600047-9). Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis // *J. Leukoc. Biol.* 1996. Vol. 59. N 2. P. 229–240.
2. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science*. 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.
3. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol.* 2007. Vol. 176. N 2. P. 231–241.
4. Steinberg B.E., Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Sci. STKE*. 2007. Vol. 2007. N 379: pe11.
5. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease // *Biochemistry (Mosc)*. 2014. Vol. 79. N 12. P. 1286–1296.
6. Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmun. Rev.* 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.
7. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology // *Biochemistry (Mosc)*. 2020. Vol. 85. N 10. P. 1178–1190.
8. Vorobjeva N.V. Neutrophil extracellular traps: new aspects // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 173–188.
9. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // *Cell. Rep.* 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.
10. Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z., Punaro M., Baisch J., Guiducci C., Coffman R.L., Barrat F.J., Banchereau J., Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus // *Sci. Transl. Med.* 2011. Vol. 3. N 73: 73ra20.
11. Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J., Barthwal M.K., Dikshit M. Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 10: e48111.
12. Rada B. Neutrophil extracellular traps and microcrystals // *J. Immunol. Res.* 2017. Vol. 2017: 2896380.
13. Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., Bernuth H.V., Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways // *Elife*. 2017. Vol. 6: e24437.
14. Babior B.M. NADPH oxidase // *Curr. Opin. Immunol.* 2004. Vol. 16. N 1. P. 42–47.
15. Steinberg S.F. Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C // *Front. Pharmacol.* 2015. Vol. 6: 128.
16. Korchak H.M., Kilpatrick L.E. Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 12. P. 8910–8917.
17. Waki K., Inanami O., Yamamori T., Nagahata H., Kuwabara M. Involvement of protein kinase Cdelta in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils // *Free Radic. Res.* 2006. Vol. 40. N 4. P. 359–367.
18. Bertram A., Ley K. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 2011. Vol. 59. N 2. P. 79–87.
19. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils in vitro // *Eur. J. Cell. Biol.* 2017. Vol. 96. N 3. P. 254–265.
20. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // *Immunobiology*. 2016. Vol. 221. N 2. P. 208–219.
21. Neeli I., Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4: 38.
22. Gray R.D., Lucas C.D., MacKellar A., Li F., Hiersemenzel K., Haslett C., Davidson D.J., Rossi A.G. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps // *J. Inflamm. (Lond.)*. 2013. Vol. 10. N 1: 12.
23. Dang P.M., Hakim J., Périani A. Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 349. N 3. P. 338–342.
24. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.
25. Soltoff S.P. Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 41. P. 37986–37992.
26. Geiszt M., Kapus A., Nemet K., Farkas L., Ligeti E. Regulation of capacitative Ca^{2+} influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 42. P. 26471–26478.
27. Harfi I., Corazza F., D'Hondt S., Sariban E. Differential calcium regulation of proinflammatory activities in human neutrophils exposed to the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating protein // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175. N 6. P. 4091–4102.
28. Xu S.Z. Rottlerin induces calcium influx and protein degradation in cultured lenses independent of effects on protein kinase C delta // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2007. Vol. 101. N 6. P. 459–464.

Поступила в редакцию 03.02.2022

После доработки 01.05.2022

Принята в печать 20.05.2022

RESEARCH ARTICLE

The role of protein kinase C isoforms in the formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva^{1,*} , S.S. Vakhlyarskaya², B.V. Chernyak³

¹Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Russian Children's Clinical Hospital, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,
117 Leninsky prospect, Moscow, 119571, Russia;

³A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–40 Leninskie Gory, Moscow, 119992, Russia

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Neutrophils release decondensed nuclear chromatin or neutrophil extracellular traps (NET) in response to a great number of physiological and pharmacological stimuli. However, apart from the host defensive function, NETs play an essential role in the pathogenesis of various autoimmune, inflammatory, and malignant diseases. Therefore, understanding the molecular mechanisms of NET formation, usually leading to the neutrophil death (NETosis), is important to control the consequences of aberrant or excessive NET release. Protein kinase C (PKC) is a serine/threonine kinase that is involved in a variety of neutrophil functions, but its role in NETosis is not well understood. Since five PKC isoforms (α , β I, β II, δ , and ζ) have been described in human neutrophils, we studied their contribution to NETosis and oxidative burst using inhibitory analysis. Using specific PKC isoform inhibitors, we have shown that PKC β , PKC δ , and PKC ζ are involved in the oxidative burst and NETosis activated by calcium ionophore A23187, while PKC β is involved in the oxidative burst and NETosis upon cell activation by diacylglycerol mimetic phorbol 12-myristate 13-acetate.

Keywords: human neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETosis, oxidative burst, protein kinase C isoforms

Funding: The research was carried out within the framework of the project “Molecular and cellular bases of immunity” (project 21-1-21, CITIS no. 121042600047-9).

Сведения об авторах

Воробьева Нина Викторовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46. e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

Вахлярская Светлана Сергеевна — канд. мед. наук, врач-аллерголог-иммунолог отделения клинической иммунологии и ревматологии Российской детской клинической больницы. Тел.: 8-800-555-04-94; e-mail: vahlyarskaya@mail.ru

Черняк Борис Викторович — докт. биол. наук, проф., зав. лаб. биоэнергетики клетки НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-50; e-mail: bchernyak1@gmail.com

ПРИЛОЖЕНИЕ

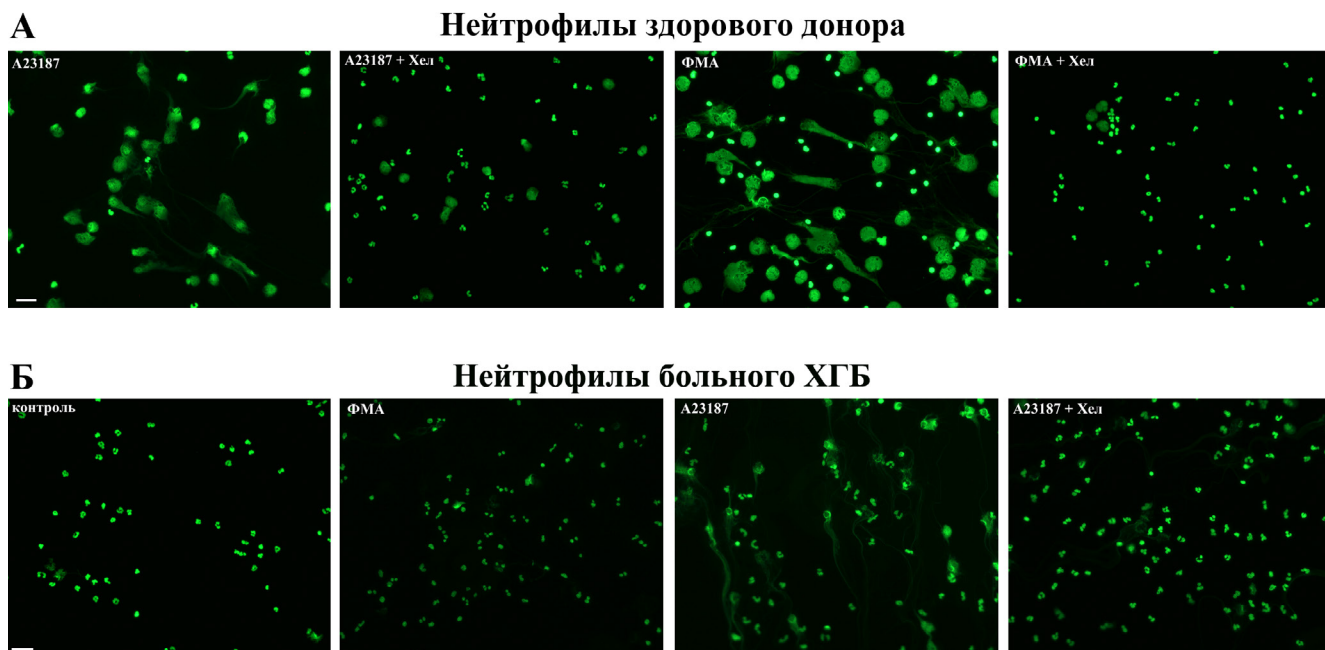


Рис. Прилож.1. Оценка участия протеинкиназы С в НЕТозе нейтрофилов человека.

Представлены фотографии нейтрофилов здорового донора, инкубированные в присутствии хелеритрина и стимулированные A23187 и ФМА. Дозы хелеритрина в случае A23187- и ФМА-стимулированных нейтрофилов составляют 0,5 мкМ и 2 мкМ соответственно. Фотографии получены с помощью микроскопа Leica DM LB, оснащенного камерой Leica DC300F («Leica Microsystems», Германия). Масштаб – 25 мкм.

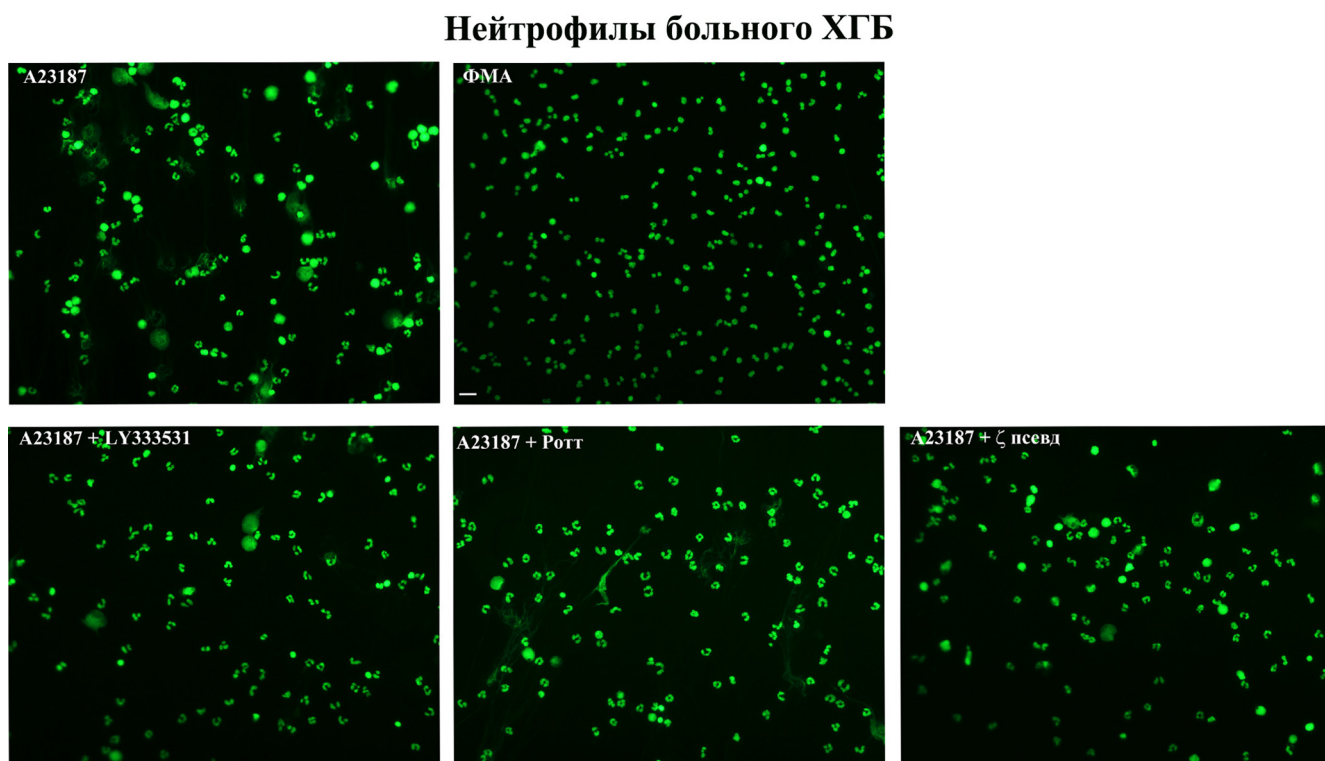


Рис. Прилож.2. Оценка участия изоформ РКС в A23187-индуцированном НЕТозе нейтрофилов пациентов с ХГБ.

На фотографиях показаны нейтрофилы больного ХГБ, инкубированные в присутствии 5 мкМ LY333531, 10 мкМ роттлерина, 10 мкМ псевдосубстрата РКС ζ и стимулированные A23187. Масштаб – 25 мкм.

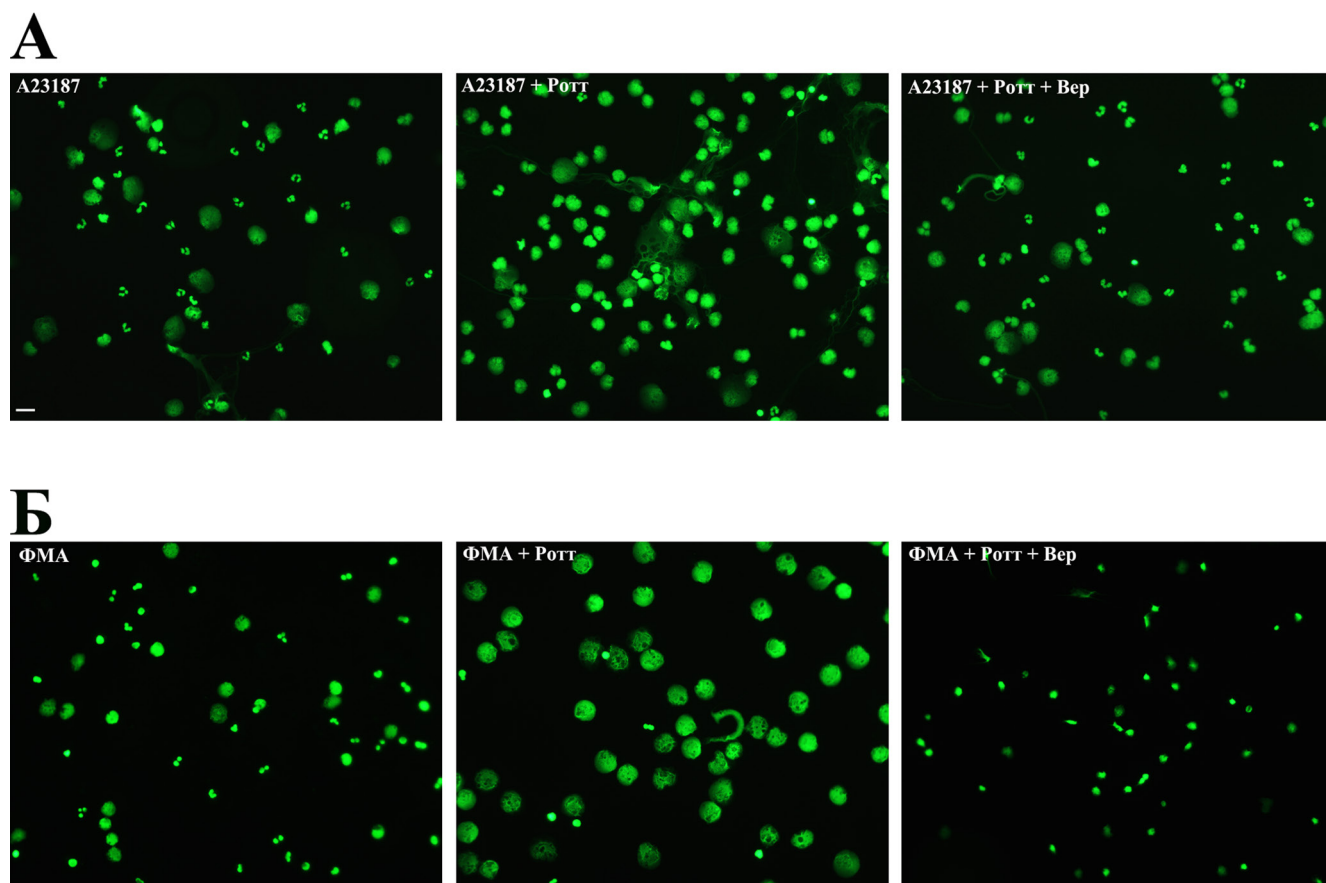


Рис. Прилож.3. Действие роттлерина на НЕТоз, индуцированный стимуляторами в низких дозах.

На фотографиях показаны нейтрофилы здорового донора, инкубированные в присутствии 50 мкМ верапамила в течение 10 мин, и 10 мкМ роттлерина – в течение последующих 30 мин. НЕТоз индуцировали слабыми дозами А23187 (1,5 мкМ) и РМА (20 нМ) в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Масштаб – 25 мкм.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.29

Рекомбинантные пептиды Ce1 и Ce4 из яда скорпиона *Centruroides elegans* и их взаимодействие с гибридными каналами KcsA-K_v1.X (x = 1, 3, 6)

Н.А. Орлов^{1, 2, 3, *} , С.А. Якимов² , О.В. Некрасова² , А.В. Феофанов^{1, 2} 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 РАН, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;³School of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, No. 1, International University Park Road, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China

*e-mail: n.orlov858@yandex.ru

Разработана методика получения рекомбинантных функционально-активных пептидов Ce1 и Ce4 из яда скорпиона *Centruroides elegans* в системе экспрессии *Escherichia coli*. Выходы Ce1 и Ce4 составили соответственно 6,5 и 12 мг с литра культуры (плотность клеток около 5 оптических единиц). Свойства полученных пептидов исследованы с применением биоинженерных систем на основе гибридных каналов KcsA-K_v1.x (x = 1, 3, 6), содержащих сайты связывания блокаторов соответствующих эукариотических калиевых каналов семейства K_v1. Показано, что рекомбинантные Ce1 и Ce4 вплоть до микромолярных концентраций не проявляют сродства к сайтам связывания каналов K_v1.1 и K_v1.6 и, подобно природным пептидам, селективно взаимодействуют с сайтом связывания канала K_v1.3: кажущиеся константы диссоциации комплексов KcsA-K_v1.3 с рекомбинантными Ce1 и Ce4 равны, соответственно, 50±10 и 200±30 нМ (среднее ± стандартная ошибка среднего).

Ключевые слова: потенциал-зависимые калиевые каналы, K_v1, гибридный калиевый канал KcsA-K_v1.3, лазерная конфокальная микроскопия, пептидные блокаторы, аффинность

Потенциал-зависимые калиевые каналы семейства K_v1 — сложные тетрамерные мембранные белки, в которых каждая субъединица содержит N- и C-концевые цитоплазматические домены, а также шесть трансмембранных альфа-спиралей, окружающих центральный ион-проводящий канал [1]. В ответ на изменение трансмембранного потенциала каналы K_v переходят из закрытого в открытое состояние, обеспечивая транспорт ионов калия через клеточную мембрану. Каналы K_v1 участвуют в реполяризации клеточной мембраны и регулируют процессы проведения нервного импульса и мышечного сокращения [1], процессы пролиферации и миграции клеток, секреции гормонов и нейромедиаторов [2, 3].

Усиление активности и/или повышение уровня экспрессии K_v1-каналов играет ключевую роль в патогенезе ряда заболеваний, а ингибирование их активности рассматривается в качестве возможной терапии данных заболеваний [4]. Гиперактивность K_v1.1 при рассеянном склерозе и травматическом повреждении спинного мозга может быть терапевтически значимо снижена блокаторами этого канала [5]. Повышенная экспрессия канала K_v1.3 способствует развитию аутоим-

мунных заболеваний [6] и играет роль в процессах нейровоспаления, характерных для ишемического инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и черепно-мозговой травмы [7]. Повышенную экспрессию канала K_v1.6 в интернейронах связывают с возникновением эпилепсии, а его ингибирование позволяет нормализовать проводимость нейронов [3].

Многие пептидные токсины из ядов животных (скорпионов, змей, морских анемонов и улиток семейства конусов) способны с высокой аффинностью и селективностью связываться с определенными типами K_v1-каналов, блокируя их [8]. Пептидные блокаторы широко используют для изучения структуры, свойств и механизмов функционирования K_v1-каналов, картирования их тканевой локализации [9–11]. Высокая избирательность взаимодействия с каналами-мишенями и низкая токсичность позволяют рассматривать некоторых представителей этих пептидов в качестве перспективных лекарственных средств [12–14].

Взаимодействие пептидных блокаторов с внешним сайтом связывания K_v1-каналов сопровождается закупориванием их поры, а также образованием множественных межмолекулярных

контактов, включающих гидрофобные и электростатические взаимодействия, а также водородные связи, что определяет специфичность и устойчивость образующегося комплекса [15–17]. Изучение пептидов-блокаторов, определение их аффинности к разным типам K_v1 -каналов и уточнение роли отдельных аминокислотных остатков в стабилизации комплексов с каналами открывает возможность направленного дизайна пептидов с заданными свойствами с потенциальным лекарственным действием.

Обнаруженные в яде скорпиона *Centruroides elegans* Се-пептиды из подсемейства α -КТх2 были охарактеризованы как блокаторы канала $K_v1.3$ человека, не взаимодействующие с кальций-активируемым каналом $K_{Ca3.1}$, калиевым каналом Shaker и каналом $K_v2.1$ крысы [18]. Пептидные блокаторы могут проявлять кросс-активность в отношении ряда каналов семейства K_v1 , однако взаимодействия Се-пептидов с другими K_v1 -каналами, в частности, с каналами $K_v1.1$ и $K_v1.6$, имеющими важное физиологическое значение в центральной нервной системе [19, 20], не исследовались. Изучение активности Се-пептидов в отношении K_v1 -каналов важно для выявления молекулярных детерминант, определяющих аффинность и селективность пептидов семейства α -КТх2 по отношению к отдельным представителям K_v1 -каналов.

В настоящей работе представлены результаты изучения свойств пептидов Ce1 и Ce4, которые первыми из пяти известных Се-пептидов удалось получить в рекомбинантной форме (далее rCe1 и rCe4). Эти пептиды (рисунок, А) длиной 39 а.о. с тремя дисульфидными связями имеют высокую гомологию с известными блокаторами K_v1 -каналов семейства α -КТх2 – хонготоксином 1 (HgTx1) [21], маргатооксином (MgTx) [22] и ноксиустоксином (NTx) [23]. Природные Ce1 и Ce4 имеют сходную субнаномолярную аффинность к каналу $K_v1.3$, но отличаются семью аминокислотными остатками (гомология 82%) и аминокислотной группой на С-конце Ce4 [18].

Свойства rCe1 и rCe4 были исследованы с применением разработанных нами ранее аналитических систем на основе гибридных каналов KcsA- $K_v1.x$ ($x = 1, 3, 6$), содержащих сайты связывания блокаторов соответствующих эукариотических каналов [17, 24, 25].

Материалы и методы

В работе использовали реагенты фирмы Merck (Германия), эндонуклеазы рестрикции KpnI и HindIII, Taq-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу, маркеры молекулярных масс белков фирмы Thermo Fisher Scientific (США), Ni-Сефарозу (Ni Sepharose Fast Flow, США) и колонки для обессоливания белков PD-10 фирмы GE Healthcare (США), штаммы клеток *Escherichia coli* BL21(DE3) и Rosetta-gami B(pLysS) фирмы Novagen (Merck, Германия).

Цистеиновую протеазу вируса гравировки табака (протеазу TEV) выделяли, как описано ранее [26]. Рекомбинантные пептиды хонготоксин 1 (HgTx1), агитоксин 2 (AgTx2) и харибдотоксин (ChTx) были получены по описанной ранее методике [27], основанной на экспрессии в *E. coli* целевого пептида в составе гибрида с мальтоза-связывающим белком (MBP). HgTx1, меченный по N-концу флуорофором Atto488 (A-HgTx1), был получен методом химического синтеза фирмой Smartox Biotechnology (Франция). AgTx2, меченный карбокситетраметилпроламином (R-AgTx2), был получен, как описано ранее [24].

Гены пептидов Ce1 и Ce4, слитых на N-конце с сайтом расщепления протеазой TEV (CS_{TEV}), были получены методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием олигонуклеотидных праймеров, содержащих 5'-концевые сайты рестрикции KpnI и 3'-концевые сайты HindIII. После гидролиза эндонуклеазами рестрикции KpnI и HindIII ПЦР-фрагменты ДНК клонировали по соответствующим сайтам в экспрессионную плазмиду pET-23d-MalE, также обработанную KpnI и HindIII [27]. Нуклеотидную последовательность целевых генов в составе плазмид pET-23d-MalE- CS_{TEV} -Ce1 и pET-23d-MalE- CS_{TEV} -Ce4 подтверждали секвенированием. Секвенирование выполнялось компанией «Евроген» (Россия).

Экспрессию и выделение пептидов проводили, как описано в работе [27]. Клетки *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)pLysS, трансформированные полученными плазмидами, выращивали в среде LB (так называемая лизогенная среда), содержащей ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (15 мкг/мл), хлорамфеникол (34 мкг/мл) и тетрациклин (12,5 мкг/мл). Культуру, выращенную при 37 °C до оптической плотности $OD_{560} = 1,0–1,5$ о.е., индуцировали изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (100 мкг/мл) и продолжали выращивать при 20 °C в течение 22 ч. Клеточную биомассу разрушали ультразвуком, нерастворимую фракцию удаляли центрифугированием при 36000g в течение 20 мин, а гибридный белок выделяли из растворимой фракции клеточного лизата хроматографией на колонке Ni Sepharose Fast Flow и обессоливали на колонке PD-10 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). Для контроля процедуры выделения целевых белков проводили электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рисунок, Б, В). Выделенные гибридные белки MBP- CS_{TEV} -Ce1 и MBP- CS_{TEV} -Ce4 гидролизовали TEV-протеазой в присутствии 0,5 мМ дитиотреитола при 20 °C в течение 16 ч. Концентрация гибридного белка в реакционной смеси составляла 2 мг/мл, концентрация TEV-протеазы – 0,5 мг/мл. Пептиды очищали методом обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на колонке Discovery Bio Wide Pore C18 (15 см $\times$ 4,6 мм, 5 мкм,

Supelco, США) с использованием линейного градиента ацетонитрила (0–35%) в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте (рисунок, Г, Д), лиофилизировали, растворяли в воде и хранили при -18°C .

Массы rCe1 и rCe4 измеряли методом MALDI-TOF-спектрометрии. Концентрацию пептидов измеряли методом спектрофотометрии в растворе 20%-ного ацетонитрила и 0,1%-ной трифторуксусной кислоты на длине волны 214 нм, используя рассчитанные по ранее опубликованно-

му методу [28] коэффициенты молярной экстинкции 55787 и $54719\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для rCe1 и rCe4 соответственно.

Выращивание клеток *E. coli*, экспрессирующих гибридные каналы KcsA-K_v1.x ($x = 1, 3, 6$), и приготовление сферопластов проводили, как описано ранее [17, 24]. Полученные сферопласты хранили в растворе 10 mM Трис-НCl, pH 8,0, 0,25 M сахарозы, 10 mM MgCl₂ при $+4^{\circ}\text{C}$ и использовали для измерений в течение двух недель.

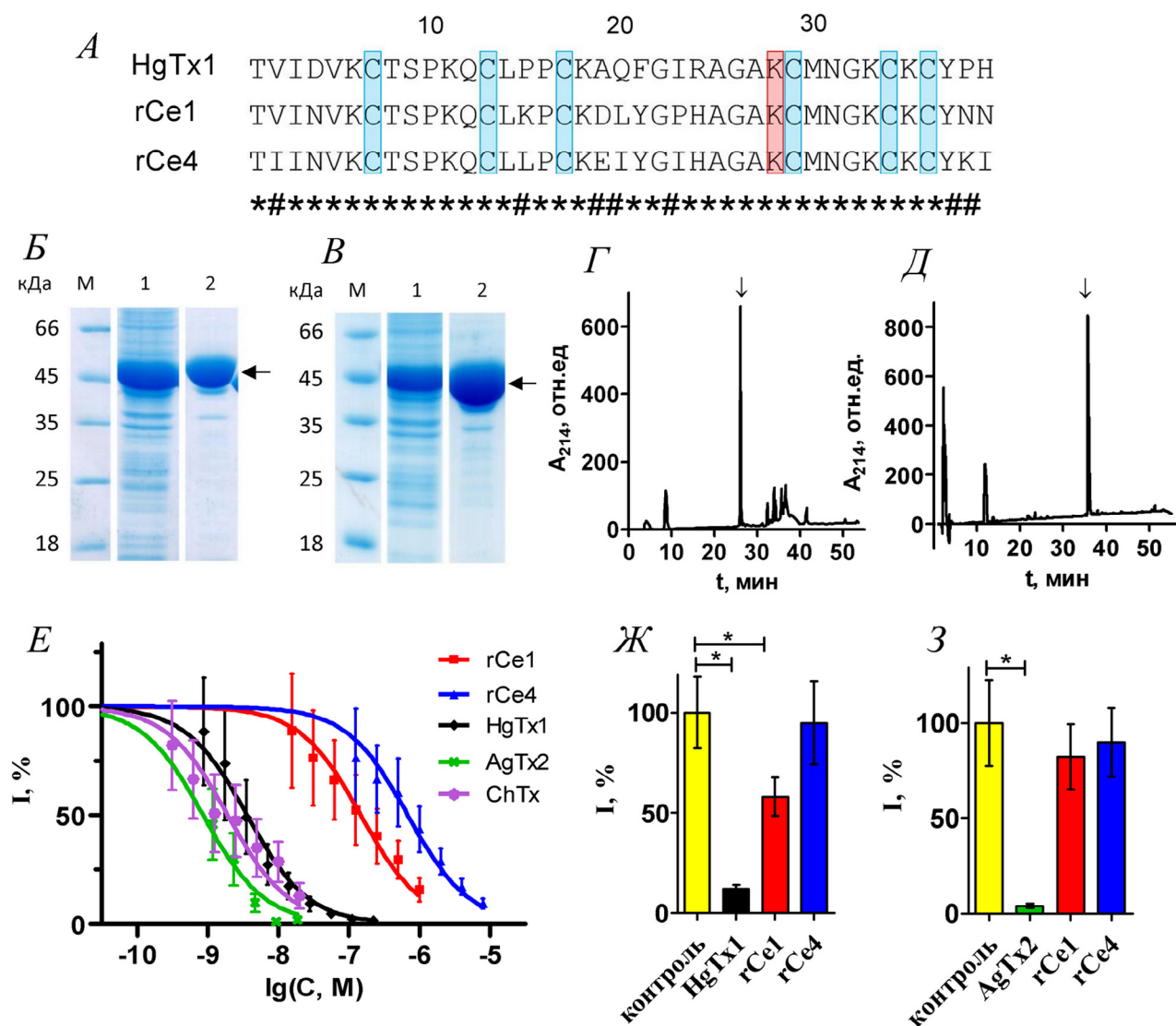


Рисунок. Получение и свойства рекомбинантных пептидов rCe1 и rCe4.

А. Сравнение аминокислотных последовательностей HgTx1, rCe1 и rCe4. Красным выделен закупоривающий пору канала а.о. лизина. Синим выделены образующие дисульфидные связи цистеины. * и # — идентичные и варибельные а.о. пептидов rCe1 и rCe4. Б, В. Анализ выделения MBP-CS_{TEV}-Ce1 (Б) и MBP-CS_{TEV}-Ce4 (В) из биомассы клеток *E. coli* методом электрофореза в денатурирующих условиях. М — белки-стандарты, Дорожки: 1 — клеточный лизат, 2 — очищенный целевой продукт. Стрелка отмечает положение целевого продукта.

Г, Д. Очистка rCe1 (Г) и rCe4 (Д), полученных гидролизом MBP-CS_{TEV}-Ce1 и MBP-CS_{TEV}-Ce4 TEV-протеазой, методом обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии. Время выхода пептидов rCe1 и rCe4 (обозначены стрелкой) — 26 и 36 мин соответственно.

Е. Концентрационная зависимость конкурентного ингибирования связывания А-HgTx1 (20 нМ) с KcsA-K_v1.3-пептидами rCe1, rCe4, HgTx1, AgTx2 и ChTx.

Ж. Анализ способности пептидов HgTx1 (100 нМ), rCe1 (7 мкМ) и rCe4 (6 мкМ) вытеснять А-HgTx1 (100 нМ) из комплекса с KcsA-K_v1.1.

З. Анализ способности пептидов AgTx2 (10 нМ), rCe1 (9 мкМ) и rCe4 (10 мкМ) вытеснять R-AgTx2 (0,5 нМ) из комплекса с KcsA-K_v1.6.

Конкурентное связывание немеченых пептидов с KcsA-K_v1.x в присутствии флуоресцентно-меченых лигандов A-HgTx1 или R-AgTx2 проводили в соответствии с описанным ранее протоколом [24]. Концентрация A-HgTx1 в реакционной смеси с каналами KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3 составляла 100 нМ и 20 нМ соответственно. Концентрация R-AgTx2 в экспериментах с KcsA-K_v1.6 составляла 0,5 нМ. Растворы немеченых пептидов готовили методом двукратных разведений в буфере С (20 мМ Трис-НСl, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, рН 7,5), смешивали с суспензией сферопластов в буфере С (до конечной концентрации 10⁴ клеток на мкл) и с флуоресцентно-меченым пептидом. Смеси инкубировали в течение 1 ч при 37 °С на шейкере (350 об./мин) и переносили в 12-луночные силиконовые кюветы flexiPERM (Perbio, Бельгия), прикрепленные к покровному стеклу. Кюветы центрифугировали при 15 °С и 200g в течение 5 мин для иммобилизации сферопластов на стекле. Концентрации пептидов варьировали в диапазоне: 16 нМ – 10 мкМ (rCe1), 0,1–10 мкМ (rCe4), 1–100 нМ (AgTx2), 0,9–230 нМ (HgTx1), 0,3–20 нМ (ChTx).

Измерения проводили на инвертированном лазерном сканирующем микроскопе LSM710 (Zeiss, Германия) с использованием масло-иммерсионного объектива αPlan-Apochromat (×100, NA 1,46) с латеральным и аксиальным разрешением 0,2 и 2 мкм соответственно. Флуоресценцию A-HgTx возбуждали на длине волны 488 нм и регистрировали в диапазоне 493–600 нм. Флуоресценцию R-AgTx2 возбуждали на длине волны 543 нм и регистрировали в диапазоне 550–685 нм.

Полученные изображения анализировали, как описано ранее [24]: рассчитывали показатели интенсивности флуоресценции для лигандов, связанных с каналами на поверхности сферопластов, и усредняли по выборке из 80–100 клеток для каждого измеренного образца. По средним значениям интенсивности строили зависимости вытеснения флуоресцентных лигандов из комплексов с KcsA-K_v1.x от концентрации конкурирующих немеченых пептидов и определяли концентрации пептидов, вытесняющих флуоресцентные лиганды из комплексов на 50% (IC₅₀).

Значения кажущихся констант диссоциации комплексов немеченых пептидов с KcsA-K_v1.x (K_{ap}) рассчитывали по формуле Ченга-Пруссофа:

$$K_{ap} = \frac{IC_{50}}{1 + L/K_d}, \quad (1)$$

где L – концентрация флуоресцентного лиганда, а K_d – константа диссоциации его комплекса с сайтом связывания исследуемого канала KcsA-K_v1.x. Соответствующие константы K_d были

определены для A-HgTx1 или R-AgTx2 ранее [29, 17]. Величины K_d комплексов A-HgTx1 с KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3 составили 44±6 нМ и 8,4±0,7 нМ соответственно [29]. Значение K_d комплекса R-AgTx2 с KcsA-K_v1.6 определено как 0,14±0,04 нМ [17] (среднее ± стандартная ошибка среднего).

Исследования проводили в трех независимых повторностях. Рассчитанные по результатам экспериментов константы K_{ap} усредняли и представляли как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Пептиды rCe1 и rCe4 были получены в рекомбинантной форме путем экспрессии в клетках *E. coli* гибридных белков MBP-CS_{TEV}-Ce1 и MBP-CS_{TEV}-Ce4 по разработанному нами методу [27]. Он позволяет обеспечить высокий уровень экспрессии целевых пептидов в растворимой форме с правильно замкнутыми дисульфидными связями и исключить процедуру ренатурации пептидов *in vitro*. Эффективной экспрессии rCe1 и rCe4 способствовали использование шапероноподобного белка-партнера MBP, снижение температуры культивации до 20 °С, а также использование штамма Rosetta-gami B(pLysS), в котором облегчено замыкание дисульфидных связей в цитоплазме. В этих условиях был обеспечен высокий уровень продукции гибридных белков (рисунок, Б и В) – около 200 мг с 1 л культуры (плотность около 5 оптических единиц).

При разделении реакционной смеси после TEV-гидролиза методом ОФ ВЭЖХ пики пептидов на хроматограмме имели симметричную форму и характерные для ренатурированных пептидов времена выхода – 26 и 36 мин для rCe1 и rCe4 соответственно (рисунок, Г, Д). Наличие множественных пиков на хроматограмме rCe1 с временами выхода более 26 мин свидетельствует о присутствии в гидролизате TEV денатурированных форм пептида, образующихся, по-видимому, из-за чувствительности rCe1 к дитиотреитолу – компоненту реакции гидролиза.

Выходы rCe1 и rCe4 составили 6,5 и 12 мг соответственно с литра культуры клеток. Молекулярные массы rCe1 и rCe4, измеренные методом MALDI-TOF-спектрометрии, были равны 4253 Да и 4296 Да, что с точностью до 1 Да соответствовало их расчетным массам (4252 и 4295 Да соответственно) с 3 дисульфидными связями. Таким образом, результаты ОФ ВЭЖХ пептидов и измерения их молекулярной массы свидетельствуют о получении rCe1 и rCe4 в ренатурированной форме.

Для изучения способности rCe1 и rCe4 взаимодействовать с внешними сайтами связывания блокаторов каналов K_v1.1, K_v1.3 и K_v1.6 применяли биоинженерные тест-системы [24], основанные на экспрессии гибридных каналов KcsA-K_v1.x

($x = 1, 3, 6$) в плазматической мембране *E. coli* и использовании флуоресцентно меченого лиганда. Удаление клеточной стенки обеспечивает доступ лигандов к гибридным каналам на поверхности мембраны. Образование комплексов лигандов с гибридными каналами в условиях конкурентного связывания позволяет провести сравнение аффинностей меченого и изучаемого (немеченого) лиганда. Надежность такого подхода подтверждена ранее в сравнительных исследованиях методами электрофизиологии [25, 30].

Взаимодействие $rCe1$ и $rCe4$ с каналом $KcsA-K_v1.3$ изучали с помощью гомологичного флуоресцентно-меченого $A-HgTx1$ и сравнивали с активностью известных пептидных блокаторов $AgTx2$, $ChTx$ и $HgTx1$. Обнаружено, что $rCe1$ и $rCe4$ вытесняют $A-HgTx1$ из комплексов с $KcsA-K_v1.3$, но уступают по активности блокаторам $AgTx2$, $ChTx$ и $HgTx1$ (рисунок, Е). Измерения показали, что кажущиеся константы диссоциации комплексов $KcsA-K_v1.3$ с $rCe1$ и $rCe4$ равны соответственно 50 ± 10 и 200 ± 30 нМ. Аналогичные константы для $AgTx2$, $ChTx$ и $HgTx1$, измеренные в параллельных экспериментах, составили соответственно $0,6 \pm 0,1$, $1,1 \pm 0,1$ и $1,07 \pm 0,03$ нМ.

Для природных пептидов $Ce1$ и $Ce4$ константы K_d , измеренные на эукариотическом канале $K_v1.3$, равны 0,7 и 0,98 нМ соответственно [18]. Измеренные в электрофизиологических экспериментах K_d комплексов $ChTx$ с каналом $K_v1.3$ составляют 0,19 нМ при экспрессии $K_v1.3$ в ооцитах лягушки [31] и 2,6 нМ при его экспрессии в клетках млекопитающих [32]. Для $AgTx2$ значение K_d по данным электрофизиологических исследований на канале $K_v1.3$ равно 0,2 нМ [33]. Соответствующая K_d для $HgTx1$, измеренная методом радиолигандного анализа при низкой ионной силе, равна 0,086 нМ [21]. Таким образом, при связывании с гибридными каналами значения K_d для токсинов $ChTx$ и $AgTx2$ сопоставимы со значениями, измеренными другими методами, а K_d пептидов $Ce1$, $Ce4$ и $HgTx1$ — представителей семейства токсинов α -КТх 2 — существенно отличаются.

Известно, что на величину измеренных K_d пептидов могут влиять выбор системы экспрессии $K_v1.3$ -канала (ооциты лягушки, линия эукариотических клеток), условия реакции связывания (ионная сила, температура) и метод измерений (методы электрофизиологии или радиолигандный анализ [24]). Причина отличий, измеренных нами и опубликованных ранее [18] величин K_d пептидов $rCe1$ и $rCe4$ пока не ясна. Для уточнения этих величин планируется провести исследования альтернативными методами. Снижение аффинности $rCe4$ по сравнению с природным пептидом может быть связано также с отсутствием С-концевой аминокислотной группы у $rCe4$. Известно, что посттрансляционное амидирование может значительно влиять

на аффинность пептидных блокаторов калиевых каналов [34].

Изучение взаимодействия $rCe1$ и $rCe4$ с сайтом связывания $K_v1.1$ показало, что $rCe4$ не вытесняет $A-HgTx1$ (100 нМ) из комплексов с $KcsA-K_v1.1$ при концентрациях до 6 мкМ, а $rCe1$ при концентрации 7 мкМ вытесняет лишь 40% $A-HgTx1$ (рисунок, Ж). В контрольном эксперименте $HgTx1$ (100 нМ) вытеснял из комплексов 90% $A-HgTx1$ (рисунок, Ж). Согласно оценке по формуле (1), аффинность $rCe1$ к сайту связывания $K_v1.1$ приблизительно в 40 раз меньше, чем к сайту $K_v1.3$. Аналогично аффинность $rCe4$ к сайту связывания $K_v1.1$ более чем в 10 раз меньше, чем к сайту $K_v1.3$.

Поскольку $A-HgTx1$ не связывается с $KcsA-K_v1.6$ [27] (как следствие низкой аффинности $HgTx1$ к каналу $K_v1.6$ [21]), изучение $rCe1$ и $rCe4$ в отношении $KcsA-K_v1.6$ проводили с помощью флуоресцентного лиганда $R-AgTx2$, имеющего высокое сродство к этому каналу [17]. Исследования показали, что $rCe1$ и $rCe4$ не конкурируют с $R-AgTx2$ (0,5 нМ) за связывание с каналом $KcsA-K_v1.6$ вплоть до концентрации 9–10 мкМ (рисунок, З). В тоже время $AgTx2$ (10 нМ) полностью вытеснял $R-AgTx2$ (0,5 нМ) из этих комплексов (рисунок, З). Согласно оценке, показатели аффинности $rCe1$ и $rCe4$ к сайту связывания $K_v1.6$ меньше, чем к сайту $K_v1.3$, по крайней мере, в 40 и 10 раз соответственно.

По аффинности к сайтам связывания каналов $K_v1.1$ и $K_v1.3$ пептиды $rCe1$ и $rCe4$ качественно похожи на гомологичные α -КТх2-блокаторы $MgTx$ и NTx , для которых показано повышенное, соответственно, в 400 и в более чем 25 раз сродство к $K_v1.3$, чем к $K_v1.1$ [22, 23]. Однако для гомологичного $HgTx1$ аффинность к $K_v1.1$, наоборот, в 3 раза выше, чем к $K_v1.3$ [21]. К $K_v1.6$ -каналу $HgTx1$ имеет очень низкую аффинность, что согласуется со свойствами $rCe1$ и $rCe4$. Сродство $MgTx$ и NTx к $K_v1.6$ по информации в базе данных *Kaliumdb* (<https://kaliumdb.org>) неизвестно.

Полученные результаты дополняют данные о свойствах пептидных блокаторов потенциал-зависимых калиевых каналов, относящихся к подсемейству α -КТх2. Выявленная селективность пептидов $rCe1$ и $rCe4$ к сайту связывания канала $K_v1.3$, возможно, связана с наличием в центральной петле пептидов отрицательно заряженных аминокислотных остатков D19 у $Ce1$ и E19 у $Ce4$, затрудняющих взаимодействие с $KcsA-K_v1.1$.

Отметим, что E19 присутствует также в NTx , который уступает $HgTx1$ по аффинности к каналу $K_v1.3$ и не взаимодействует с $K_v1.1$. Еще одним фактором, способным модулировать аффинность α -КТх2-пептидов к K_v1 -каналам, могут быть отличия в аминокислотной последовательности С-концевых участков пептидов (рисунок, А).

По данным молекулярного моделирования С-конец играет важную роль при взаимодействии пептидов α -КТх2 с каналом K_v1.3 [35].

Планируемые в дальнейшем исследования свойств Се-пептидов методом сайт-направленного мутагенеза позволят выяснить роль конкретных аминокислотных остатков и их комбинаций в специфике взаимодействия изучаемых блокаторов с K_v1-каналами.

Авторы благодарят Ю.В. Королькову за предоставление R-AgTx2, а также М.В. Серебрякову

за измерения масс пептидов методом масс-спектрометрии. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-74-30014). Исследования были частично выполнены с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jan L.Y., Jan Y.N. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling // *J. Physiol.* 2012. Vol. 590. N 11. P. 2591–2599.
2. González C., Baez-Nieto D., Valencia I., Oyarzún I., Rojas P., Naranjo D., Latorre R. K⁺ channels: functional structural overview // *Compr. Physiol.* 2012. Vol. 2. N 3. P. 2087–2149.
3. Chow L.W.C., Leung Y.M. The versatile Kv channels in the nervous system: actions beyond action potentials // *Cell. Mol. Life Sci.* 2020. Vol. 77. N 13. P. 2473–2482.
4. Wulff H., Castle N.A., Pardo L.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009. N 12. P. 982–1001.
5. Beraud E., Viola A., Regaya I., Confort-Gouny S., Siaud P., Ibarrola D., le Fur Y., Barbaria J., Pellissier J.F., Sabatier J.M., Medina I., Cozzzone P.J. Block of neural Kv1.1 potassium channels for neuroinflammatory disease therapy // *Ann. Neurol.* 2006. Vol. 60. N 5. P. 586–596.
6. Cañas C.A., Castaño-Valencia S., Castro-Herrera F. Pharmacological blockade of KV1.3 channel as a promising treatment in autoimmune diseases // *J. Transl. Autoimmun.* 2022. Vol. 5: 100146.
7. Fomina A.F., Nguyen H.M., Wulff H. Kv1.3 inhibition attenuates neuroinflammation through disruption of microglial calcium signaling // *Channels.* 2021. Vol. 15. N 1. P. 67–78.
8. Kuzmenkov A.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Diversity of potassium channel ligands: focus on scorpion toxins // *Biochemistry (Mosc).* 2015. Vol. 80. N 13. P. 1764–1799.
9. Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel // *Elife.* 2013. N 2: e00594.
10. Hu L., Pennington M., Jiang Q., Whartenby K.A., Calabresi P.A. Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes // *J. Immunol.* 2007. Vol. 179. N 7. P. 4563–4570.
11. Doczi M.A., Morielli A.D., Damon D.H. Kv1.3 channels in postganglionic sympathetic neurons: Expression, function, and modulation // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008. Vol. 295. N 3. P. R733–R740.
12. Pennington M.W., Czerwinski A., Norton R.S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential // *Bioorganic Med. Chem.* 2018. Vol. 26. N 10. P. 2738–2758.
13. Gubič Š., Hendrickx L.A., Toplak Ž., Sterle M., Peigneur S., Tomašić T., Pardo L.A., Tytgat J., Zega A., Mašič L.P. Discovery of KV1.3 ion channel inhibitors: Medicinal chemistry approaches and challenges // *Med. Res. Rev.* 2021 Vol. 41. N 4. P. 2423–2473.
14. Tarcha E.J., Olsen C.M., Probst P., Peckham D., Muñoz-Elías E.J., Kruger J.G., Iadonato S.P. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial // *PLoS One.* 2017. Vol. 12. N 7: e0180762.
15. Rodríguez De La Vega R.C., Merino E., Becerril B., Possani L.D. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins // *Trends Pharmacol. Sci.* 2003. Vol. 24. N 5. P. 222–227.
16. Giangiacomo K.M., Ceralde Y., Mullmann T.J. Molecular basis of alpha-KTx specificity // *Toxicon.* 2004. Vol. 43. N 8. P. 877–886.
17. Nekrasova O.V., Volynseva A.D., Kudryashova K.S., Novoseletsky V.N., Lyapina E.A., Illarionova A.V., Yakimov S.A., Korolkova Y.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Complexes of peptide blockers with Kv1.6 pore domain: molecular modeling and studies with KcsA-Kv1.6 channel // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2017. Vol. 12. N 2. P. 260–276.
18. Olamendi-Portugal T., Somodi S., Fernández J.A., Zamudio F.Z., Becerril B., Varga Z., Panyi G., Gáspár R., Possani L.D. Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells // *Toxicon.* 2005. Vol. 46. N 4. P. 418–429.
19. D'adamo M.C., Liantonio A., Rolland J.F., Pessia M., Imbrici P. Kv1.1 channelopathies: Pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. N 8: 2935.
20. Peck L.J., Patel R., Diaz P., Wintle Y.M., Dickenson A.H., Todd A.J., Calvo M., Bennett D.L.H. Studying independent Kcna6 knock-out mice reveals toxicity of exogenous LacZ to central nociceptor terminals and differential effects of Kv1.6 on acute and neuropathic pain sensation // *J. Neurosci.* 2021. Vol. 41. N 44. P. 9141–9162.
21. Koschak A., Bugianesi R.M., Mitterdorfer J., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Knaus H.G. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from

Centruroides limbatus venom // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. N 5. P. 2639–2644.

22. Bartok A., Toth A., Somodi S., Szanto T.G., Hajdu P., Panyi G., Varga Z. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels // Toxicon. 2014. Vol. 87. P. 6–16.

23. Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines // Mol. Pharmacol. 1994. Vol. 45. N 6. P. 1227–1234.

24. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin E.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study // Anal. Bioanal. Chem. 2013. Vol. 405. N 7. P. 2379–2389.

25. Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1: an integrated transcriptomic and proteomic study // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290. N 19. P. 12195–12209.

26. Tropea J.E., Cherry S., Waugh D.S. Expression and purification of soluble His₆-tagged TEV protease // High throughput protein expression and purification. Methods in Molecular Biology, vol. 498. / Ed. S.A. Doyle. Humana press, 2009. P. 297–307.

27. Nekrasova O., Kudryashova K., Fradkov A., Yakimov S., Savelieva M., Kirpichnikov M., Feofanov A. Straight-forward approach to produce recombinant scorpion toxins—Pore blockers of potassium channels // J. Biotechnol. 2017. Vol. 241. P. 127–135.

28. Kuipers B.J.H., Gruppen H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis // J. Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55. N 14. P. 5445–5451.

29. Orlov N., Nekrasova O., Feofanov A. Fluorescent ligands of Kv1 channels on the basis of hongotoxin: Atto488-hongotoxin // Microsc. Microanal. 2019. Vol. 25. Suppl. 2. P. 1278–1279.

30. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., Vassilevski A.A. Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels // Sci. Rep. 2016. Vol. 6: 33314.

31. Denisova K.R., Orlov N.A., Yakimov S.A., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. GFP-margatoxin, a genetically encoded fluorescent ligand to probe affinity of Kv1.3 channel blockers // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. N 3: 1724.

32. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom // Biochemistry. 1994. Vol. 33. N. 22. P. 6834–6839.

33. George Chandy K., Cahalan M., Pennington M., Norton R.S., Wulff H., Gutman G.A. Potassium channels in T lymphocytes: Toxins to therapeutic immunosuppressants // Toxicon. 2001. Vol. 39. N 9. P. 1269–1276.

34. Legros C., Pollmann V., Farrell A.M., Bougis P.E., Martin-eauclaire M., Pongs O. Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels // Biochemistry. 2000. Vol. 275. N 22. P. 16918–16924.

35. Chen R., Chung S.H. Binding modes of two scorpion toxins to the voltage-gated potassium channel Kv1.3 revealed from molecular dynamics // Toxins. 2014. Vol. 6. N 7. P. 2149–2161.

Поступила в редакцию 17.04.2022

После доработки 06.05.2022

Принята в печать 23.05.2022

RESEARCH ARTICLE

Recombinant peptides Ce1 and Ce4 from venom of scorpion *Centruroides elegans* and their interactions with hybrid channels KcsA-Kv1.x (x = 1, 3, 6)

N.A. Orlov^{1, 2, 3, *} , S.A. Yakimov² , O.V. Nekrasova² , A.V. Feofanov^{1, 2} 

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

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

³School of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, No. 1, International University Park Road, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China

*e-mail: n.orlov858@yandex.ru

A technique has been developed for obtaining recombinant functionally-active peptides Ce1 and Ce4 from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* in the *E. coli* expression system. The yields of peptides Ce1 and Ce4 were 6.5 and 12 mg per liter of culture, respectively. The properties of the obtained peptides were studied using bioengineered systems based on hybrid

channels KcsA-K_v1.x (x=1, 3, 6) containing blocker binding sites of the corresponding eukaryotic potassium channels of K_v1-family. It has been shown that recombinant Ce1 and Ce4 do not exhibit affinity to the binding sites of Kv1.1 and Kv1.6 channels up to micromolar concentrations and, like natural peptides, selectively interact with the binding site of Kv1.3 channel: the apparent dissociation constants of KcsA-Kv1.3 complexes with recombinant Ce1 and Ce4 are 50±10 and 200±30 nM, respectively.

Keywords: *potential-dependent potassium channels, K_v1, hybrid potassium channel KcsA-Kv1.3, laser confocal microscopy, peptide blockers, affinity*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-74-30014. The research was partially performed using facilities of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology”.

Сведения об авторах

Орлов Никита Александрович — аспирант, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, инженер лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-336-64-55; e-mail: n.orlov858@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0693-7091>

Якимов Сергей Александрович — инженер-исследователь группы нанобиоинженерии ИБХ РАН. Тел. 8-495-330-66-38; e-mail: sa-yakimov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1586-3349>

Некрасова Оксана Васильевна — канд. биол. наук, руководитель группы нанобиоинженерии отдела биоинженерии ИБХ РАН. Тел. 8-495-330-66-38; e-mail: okatja@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7216-1618>

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 57.024+616.895

Сравнительное исследование динамики материнского поведения крыс Вистар и крыс линии ГК с предрасположенностью к кататоническим реакциям**О.И. Прокудина** *Лаборатория эволюционной генетики, Институт цитологии и генетики, СО РАН,
Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10**e-mail: petrenko@bionet.nsc.ru*

Материнское поведение является важным фактором, влияющим на развитие потомства у млекопитающих. Особенности материнского поведения в ранний период онтогенеза могут оказывать стойкое влияние на ряд поведенческих и физиологических характеристик потомков во взрослом возрасте. В данной работе исследовали материнское поведение крыс линии ГК (от слов «генетические кататоники») и контрольных крыс Вистар с 1-х по 20-е сут после родов. Наблюдения проводили в домашней клетке в разное время суток с помощью автоматизированной системы видеорегистрации без присутствия экспериментатора. Показано, что самки линии ГК чаще бывали в гнезде и чаще кормили детенышей по сравнению с самками крыс Вистар. Кормящие самки Вистар чаще «отдыхали» вне гнезда, реже манипулировали гнездовым материалом и реже ухаживали за своей шерстью в течение суток. Изменение параметров материнского поведения по мере взросления потомства имело сходную динамику у обеих линий. При сравнении активности крыс в светлое и темное время суток обнаружена большая активность вне гнезда в ночное время у самок линии ГК. Предполагается, что отличия в материнском поведении крыс кататонической линии могут быть обусловлены большей тревожностью крыс линии ГК по сравнению с контрольными крысами.

Ключевые слова: материнское поведение, каталепсия, кататония, крысы линии ГК, циркадный ритм, экспериментальные модели

Влияние ранней среды на становление функций организма в настоящее время не подвергается сомнению. Одним из важнейших факторов, формирующих раннюю среду, у млекопитающих является мать. Материнское поведение в критические периоды онтогенеза специфически изменяет экспрессию ряда генов в различных областях мозга потомков [1, 2], оказывая стойкое влияние на их нейроэндокринные, поведенческие и когнитивные характеристики [3, 4].

Данная работа проведена на линии крыс ГК (названной по первым буквам слов «генетические кататоники»), рассматриваемой нами как экспериментальная модель кататонических нарушений [5, 6]. Кататонический синдром, включающий в себя как ступор, так и психомоторное возбуждение, у человека наблюдается при ряде заболеваний, в том числе при аффективных расстройствах и шизофрении [7]. Известно, что материнское поведение женщин, страдающих шизофренией или депрессией, несет специфические черты — избегание контактов со своими детьми, снижение реакции на исходящие от них сигналы и др. [8–10]. На моделях психопатологий получены данные об из-

менениях в материнском поведении экспериментальных животных. У крыс линии FSL (Flinders Sensitive Line), предлагаемых в качестве генетической модели депрессии, выявлено «худшее» материнское поведение по сравнению с линиями Спрэг-Дуэли (Sprague–Dawley) и FRL (Flinders Resistant Line) [11]. Снижение материнской мотивации показано у крыс линии WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo from Rijswijk) с absence-эпилепсией, характеризующихся депрессивно-подобным поведением [12, 13]. Материнское поведение крыс линии ГК исследовалось ранее [14], но в процессе селекции линии мы столкнулись с феноменом патоморфоза каталептической реакции. Если на ранних стадиях селекции кататонический генотип на фенотипическом уровне проявлялся в повышенной предрасположенности к застыванию, то на данном этапе в ответ на внешние раздражители у животных можно наблюдать также вокализацию, пароксизмальный бег и прыжки [15]. В связи с этим встал вопрос, претерпели ли изменения другие формы поведения у животных линии ГК.

Известно, что у пациентов, страдающих аффективными расстройствами и психопатологиями,

наблюдается нарушение суточных ритмов [16, 17]. Это обусловило интерес к особенностям суточной активности крыс линии ГК как линии с патологическим поведением.

Целью работы было изучение особенностей материнского поведения и суточной активности самок линии с кататоническими проявлениями. Для этого впервые было проведено сравнительное исследование поведения кормящих самок линий Вистар и ГК методом круглосуточной видеорегистрации.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В работе использовали белых крыс (*Rattus norvegicus*) линии ГК и Вистар. Линия ГК была создана в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) путем селекции крыс из популяции Вистар на усиленную реакцию пассивно-оборонительного застывания [5]. Экспериментальных животных содержали в конвенциональном виварии ИЦиГ СО РАН в группах по 4 животных одного пола при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Замену воды и корма проводили ежедневно. В возрасте 4 мес. проводили попарное ссаживание самцов и виргинных самок весом 250–300 г. Беременных самок отсаживали в клетки стандартного размера (50 × 33 × 20 см), оборудованные системой видеонаблюдения с высокочувствительными видеокамерами, позволяющими вести регистрацию не только в светлое, но и в темное время суток [18]. Эксперимент проводили в осенний период (рассвет-закат: 8:30–18:00). Поскольку на материнское поведение влияет не только число детенышей в помете, но и искусственное изменение этого числа [19], то выравнивание размеров помётов не проводили. Экспериментальные группы включали по шесть самок каждой линии, в помётах которых было 6–10 крысят.

Исследование материнского поведения. День родов принимали за нулевой день, материнское поведение анализировали в домашней клетке с 1-х по 20-е сут после родов. Регистрацию поведения самок проводили в автоматическом режиме шесть раз в сутки (с 02:00, 09:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00). Для этого в течение часа каждые три минуты (20 раз в течение одной сессии) производили 10-секундную видеозапись и фиксировали паттерн поведения самки и нахождение ее в гнезде или вне его на момент начала видеозаписи. За сутки совершали 120 наблюдений за каждой самкой. Отмечали паттерны поведения самки, направленные на детенышей (кормление, вылизывание и груминг, перетаскивание), паттерны индивидуального поведения (ест или пьет, вертикальная и горизонтальная двигательная активность, ауто-груминг, манипуляции с гнездовым материалом, отдых — сидит или лежит — отдельно от детены-

шей). Выделяли три позы кормления: а) «арка» — мать нависает над детенышами, спина выгнута в виде арки, лапы широко расставлены (arched-nursing); б) «одеяло» — самка практически лежит на детенышах, спина не выгнута (blanket-nursing); в) «сбоку» — крыса лежит на боку или на спине (passive-nursing) [20]. Кроме этого, оценивали интегральный показатель — активность самки вне гнезда, включающий в себя все индивидуальные паттерны поведения самки кроме отдыха.

Для дальнейшего анализа весь период наблюдения был разделен на четыре этапа по пять суток (1–5, 6–10, 11–15 и 16–20 сут после родов). Конечные результаты представляли собой суммарное число наблюдений того или иного паттерна за каждый из периодов (максимально возможное число наблюдений паттерна за период — 600). При оценке суточной активности суммировали результаты, полученные в светлое (09:00 и 14:00) и темное (2:00 и 23:00) время суток (максимально возможное число наблюдений паттерна для каждого времени суток за период — 200).

Статистическая обработка. Проверку нормальности распределения проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для выявления межлинейных различий для данных, имеющих нормальное распределение, использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для повторных измерений (с генотипом в качестве фактора). При выявлении влияния фактора генотипа или периода наблюдения проводили соответствующие апостериорные сравнения с использованием критерия Fisher LSD. При оценке межлинейных различий сравнение проводили внутри одного периода наблюдений. При оценке влияния периода наблюдения проводили сравнение первого периода с последующими. Когда проверка данных не подтверждала нормальность распределения, межлинейные сравнения проводились с использованием критерия Манна-Уитни. При сравнении активности в дневное и ночное время суток внутри одной линии использовали t-критерий для зависимых выборок. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Обработку проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). На рисунках представлены средние значения и ошибка среднего ($M \pm SEM$).

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании выявлено влияние генотипа на некоторые паттерны поведения самки, направленные на детенышей (рис. 1, А–В). Самки линии ГК чаще бывали в гнезде ($F_{1,10} = 9,49$, $p < 0,02$), у них было зарегистрировано большее суммарное число поз кормления ($F_{1,10} = 7,07$, $p < 0,03$) и число кормлений в позе «одеяло» ($F_{1,10} = 11,35$, $p < 0,008$). Влияния фактора генотипа на число кормлений в пассивной позе «сбоку» и в позе «арка» не обнаружено (рис. 1, Г, Д).

Также не выявлено межлинейных различий в частоте вылизывания и груминга детенышей матерями (рис. 1, Е). В первый период наблюдений (1–5-е сут после родов) было обнаружено, что самки крыс Вистар чаще перетаскивали детенышей ($p < 0,03$, $U = 3,5$). Это относительно редкая форма поведения, которую единично наблюдали во второй и третий периоды, а в четвертый период не регистрировали ни у одной из самок.

Были обнаружены межлинейные различия в индивидуальном поведении (рис. 2, А–В). Самки линии ГК чаще манипулировали опилками ($F_{1,10} = 12,89$, $p < 0,005$), и у них чаще был отмечен аутогруминг ($F_{1,10} = 16,05$, $p < 0,002$). Самки крыс Вистар чаще сидели или лежали отдельно от детенышей ($F_{1,10} = 17,02$, $p < 0,002$).

Самки линии ГК чаще находились в гнезде и чаще кормили детенышей, чем самки Вистар,

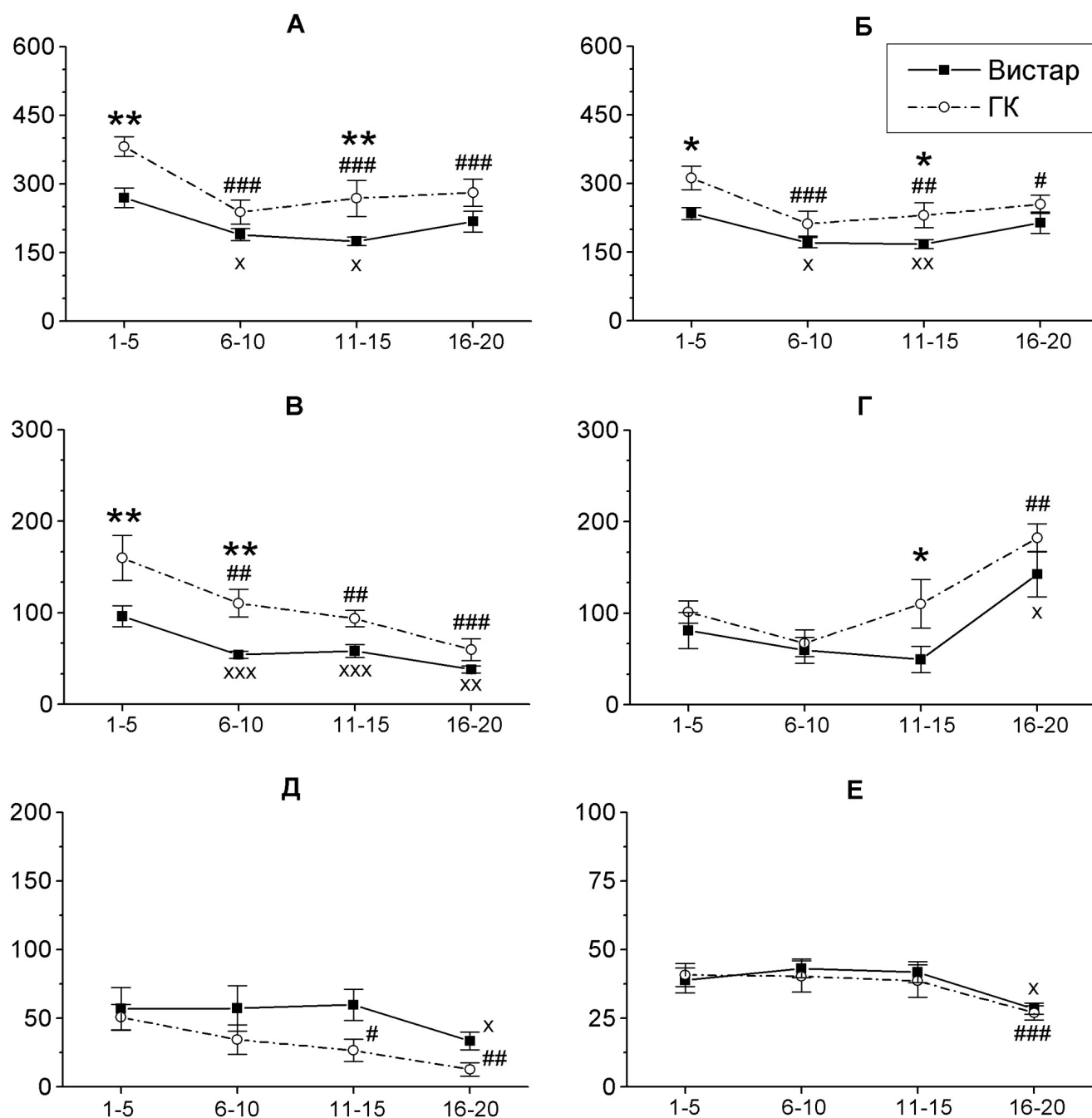


Рис. 1. Показатели направленного на детенышей поведения самок крыс линии ГК (пунктирная линия) и крыс Вистар (сплошная линия) с 1-х по 20-е сут после родов. А – нахождение в гнезде; Б – суммарное кормление; В – кормление в позе «одеяло»; Г – кормление в позе «сбоку»; Д – кормление в позе «арка»; Е – вылизывание и груминг детенышей. Представлены средние значения и ошибки среднего ($M \pm SEM$). Размер каждой группы: $n = 6$. По оси ординат – число наблюдений, по оси абсцисс – сутки после родов. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ ГК по сравнению с Вистар; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ по сравнению с 1–5 сут после родов у ГК; x – $p < 0,05$, xx – $p < 0,01$, xxx – $p < 0,001$ по сравнению с 1–5 сут после родов у Вистар.

демонстрируя таким образом более высокий уровень материнской заботы (рис. 1, А–Б). В литературных источниках приводятся убедительные доказательства того, что повышенный уровень ухода за детенышами коррелирует с повышенной тревожностью матери. Такие данные получены на кормящих самках Вистар, различающихся по уровню тревожности [21], на высоко- и низкоактивных в условиях новизны крысах линий bHR (bred High Responder) и bLR (bred Low Responder) [22], на крысах линий HAB (High Anxiety-related Behavior) и LAB (Low Anxiety-related Behavior) [23, 24] и на мышах линий HAB (High Anxiety-related Behavior) и LAB (Low Anxiety-related Behavior) [25], отличающихся по тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте. Крысы линии ГК характеризуются повышенной тревожностью в поведенческих тестах, более высокой амплитудой стартл-рефлекса, свидетельствующей о большей выраженности реакции страха [6]. С этой точки зрения, обнаруженный стиль материнства у крыс линии ГК находится в согласии с данными других исследователей. С другой стороны, ранее нами было обнаружено, что крысы

линии ГК проводят меньше времени в контакте с детенышами, чем самки Вистар [14]. Вопрос, с чем связано обнаруженное в данной работе увеличение материнской заботы у крыс кататонической линии, требует дополнительного исследования. Причина может быть связана с эндогенными механизмами, обуславливающими наблюдаемый в ходе селекции патоморфоз каталептической реакции у крыс ГК [15]. Кроме того, материнское поведение является довольно зависимым от внешних факторов и стрессирующих воздействий [26]. Способ регистрации поведения животных также оказывает влияние на результаты – при исследовании поведения крыс линии SHR (Spontaneously Hypertensive Rats), авторы получили противоположные данные о частоте кормления детенышей матерями гипертензивной линии по сравнению с контролем при наблюдении экспериментаторами и при наблюдении с помощью видеокамер [27]. В нашей ранней работе [14] мы применяли визуальную регистрацию поведения и проводили тест по возвращению крысят в гнездо (home-cage retrieval test), тогда как в данном эксперименте кормящие самки не подвергались стрессу.

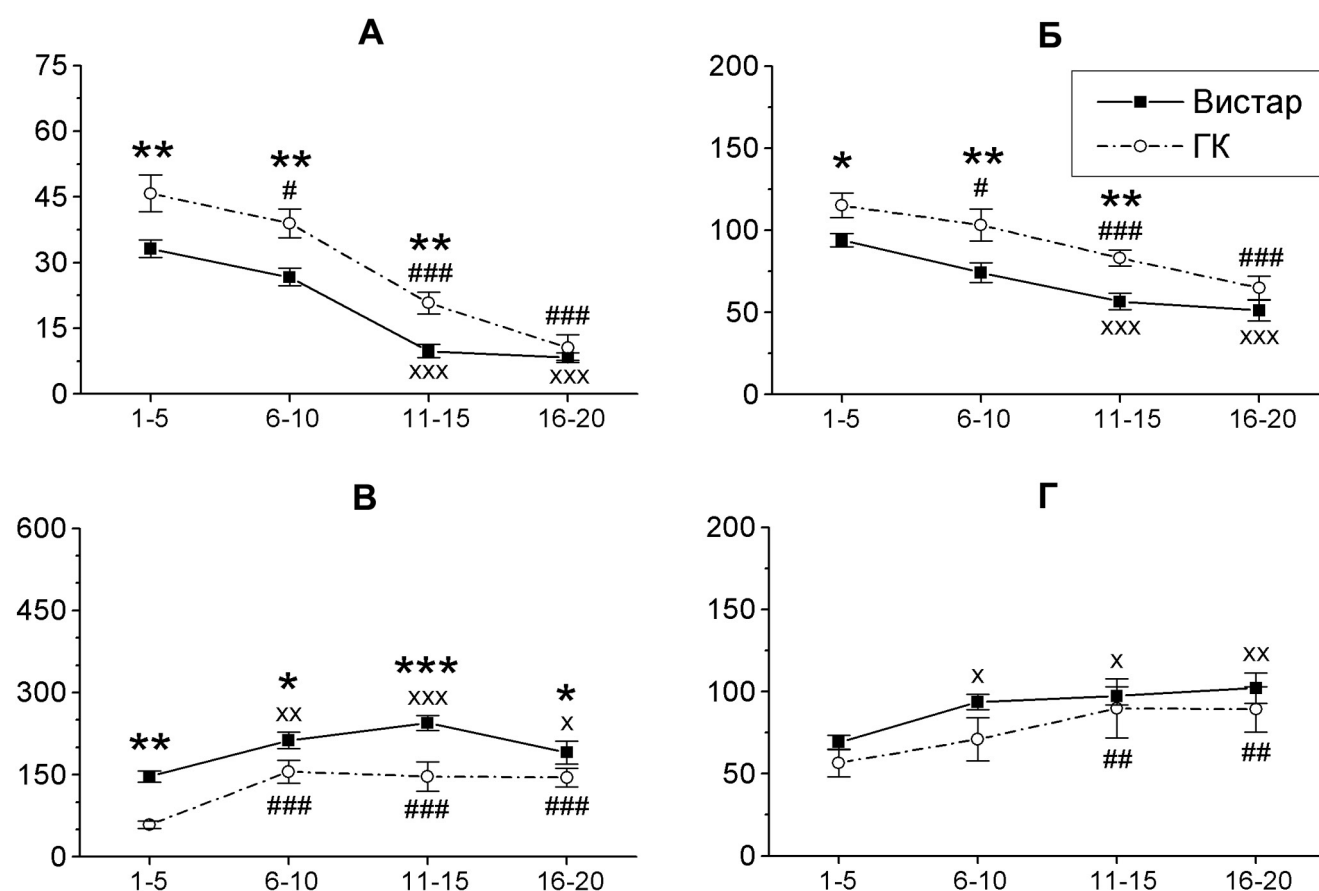


Рис. 2. Показатели индивидуального поведения самок крыс линии ГК (пунктирная линия) и крыс Вистар (сплошная линия) с 1-х по 20-е сут после родов. А – манипуляции с опилками; Б – аутогroomинг; В – отдых; Г – потребление пищи или питье. Представлены средние значения и ошибка среднего ($M \pm SEM$). Размер каждой группы: $n=6$. По оси ординат число наблюдений, по оси абсцисс – сутки после родов. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ ГК по сравнению с Вистар; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ по сравнению с 1–5 сут после родов у ГК; x – $p < 0,05$, xx – $p < 0,01$, xxx – $p < 0,001$ по сравнению с 1–5 сут после родов у Вистар.

Важными компонентами материнского поведения, влияющими на психоэмоциональные и нейроэндокринные характеристики потомства, считают груминг, вылизывание крысят и кормление в позе «арки» [2]. По этим показателям межлинейных отличий не выявлено (рис. 1, Д, Е). Перетаскивание крысят, которое чаще регистрировали у крыс Вистар в первые 5 сут лактации, рассматривается как проактивное материнское поведение и как показатель высокой материнской мотивации [24]. Однако в литературе эта форма поведения в основном обсуждается в контексте тестов с нарушением привычного окружения кормящей самки (например, тест по возвращению крысят в гнездо) [11, 28], и мы ранее находили, что в этом тесте самки Вистар успешнее справлялись с переносом детенышей [14]. Перенос детенышей самкой инициируется в том числе и ультразвуковой вокализацией крысят, которую они издадут в условиях дискомфорта [11], поэтому однозначно отнести этот паттерн к «лучшему» или «худшему» материнскому поведению в условиях домашней клетки, на наш взгляд, затруднительно.

Как видно из рис. 1 и 2, динамика материнского поведения была в целом одинакова у крыс обеих линий. Взаимодействия факторов генотипа и периода наблюдения не выявлено. Показано снижение частоты пребывания в гнезде ($F_{3,30}=14,47$, $p<0,0001$) и частоты кормления ($F_{3,30}=9,80$, $p<0,001$) начиная с периода 6–10 сут после родов. У крыс Вистар к третьей неделе после родов достоверные различия по частоте этих паттернов по сравнению с первым периодом наблюдения исчезали. В этой связи стоит отметить, что если на ранних стадиях онтогенеза кормление детенышей происходит по инициативе самки, то 3-недельные крысята уже сами могут влиять на количество кормлений [29], и выявленные изменения могут быть объяснены в том числе и актив-

ностью детенышей. Было обнаружено снижение частоты груминга крысят ($F_{3,30}=11,85$, $p<0,0001$), числа эпизодов аутогруминга ($F_{3,30}=23,27$, $p<0,001$) и манипуляций с опилками ($F_{3,30}=84,5$, $p<0,0001$) по мере взросления потомства. При этом происходило постепенное увеличение частоты питья и потребления еды самкой ($F_{3,30}=8,35$, $p<0,001$), а также, начиная со второго периода, увеличение частоты отдыха самки ($F_{3,30}=15,71$, $p<0,0001$) по сравнению с первыми 5 сут после родов. В последнем периоде наблюдения у крыс Вистар было обнаружено снижение числа эпизодов отдыха по сравнению с третьим периодом ($p<0,05$), разница с первым периодом оставалась достоверной.

Анализ частоты различных поз кормления (рис. 1, В–Д) показал, что на фоне снижения кормления в позах «арки» ($F_{3,30}=5,69$, $p<0,003$) и «одеяла» ($F_{3,30}=22,12$, $p<0,0001$) к третьей неделе вскармливания увеличивается число пассивных поз кормления «сбоку» ($F_{3,30}=14,16$, $p<0,0001$). Сходные результаты были получены на крысах линий bHR и bLR. Было показано, что частота кормления в пассивной позе возрастает по мере взросления детенышей [30]. Известно, что эффективность молокоотдачи не одинакова в различных позах. Считается, что кормление в позе «арка» соответствует максимальному выделению молока. А при кормлении в позе «сбоку» количество выделяемого молока минимально [31]. Вероятно, наблюдаемое соотношение поз кормления отражает снижение потребности крысят в молоке по мере перехода на смешанный тип питания.

Сравнение суммарной активности самок вне гнезда за сутки не выявило межлинейных отличий ни в один из исследованных периодов. При рассмотрении показателей активности самок отдельно в дневные и ночные часы, были обнаружены генетические различия (рис. 3). Была показана бо-

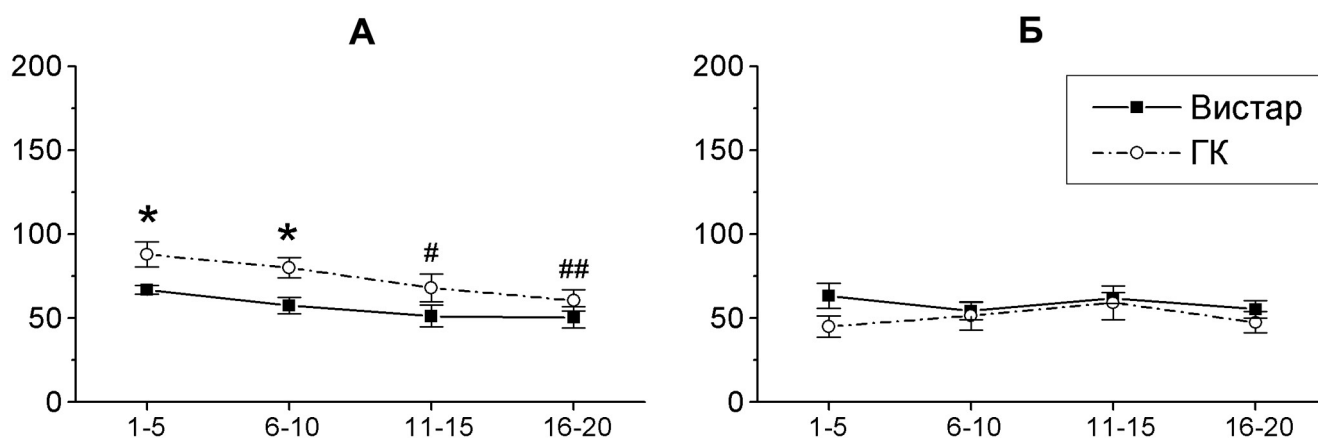


Рис. 3. Активность самок крыс линии ГК (пунктирная линия) и крыс Вистар (сплошная линия) с 1-х по 20-е сут после родов в дневное и ночное время суток. А – активность в темное время суток; Б – активность в светлое время суток. Представлены средние значения и ошибка среднего ($M \pm SEM$). Размер каждой группы: $n=6$. По оси ординат число наблюдений, по оси абсцисс – сутки после родов. * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ ГК по сравнению с Вистар; # – $p<0,05$, ## – $p<0,01$ по сравнению с 1–5 сут после родов у ГК.

лее высокая ночная активность у самок линии ГК по сравнению с крысами Вистар ($F_{1,10}=10,49$, $p<0,009$), а также по сравнению с их собственной активностью в дневные часы (для первого периода: $p<0,004$, для второго периода: $p<0,04$). У самок Вистар отличий в уровне активности в дневные и ночные часы не выявлено. Также показано влияние периода наблюдений ($F_{3,30}=5,79$, $p<0,003$) на уровень активности кормящих самок в ночные часы — активность снижается по мере роста детенышей. Зависимость активности самки в дневные часы от возраста крысят не обнаружена.

Крысы являются ночными животными с пиком активности, приходящимся на темное время суток. Известно, что в норме в период лактации лабораторные крысы менее активны и различия в суточной активности менее выражены [32]. В литературе приводятся данные о большей активности в темное время суток кормящих самок линии bHR, характеризующихся повышенной тревожностью, по сравнению с низкотревожными крысами линии bLR [30]. При изучении депрессивно-подобного поведения у самок крыс после окончания вскармливания детенышей, было обнаружено, что матери с депрессивно-подобным поведением демонстрируют повышение активности в ночную фазу суточного цикла в период вскармливания [33]. Повышенная активность кормящих самок ГК в ночное время суток напоминает таковую у крыс с высокой тревожностью и депрессивно-подобным поведением. Стоит заметить, что ряд характеристик крыс линии ГК схож с гомологичными показателями, описанными при депрессии [6].

Изучение циркадных ритмов самок линии ГК ранее не проводили, однако исследования, выпол-

ненные на самцах, позволяют предполагать нарушение суточных ритмов у крыс этой линии. Так, были обнаружены различия в суточных колебаниях активности моноаминоксидазы в головном мозге [34], в активности ферментов в лимфоцитах крови и в суточных вариациях количества клеток в лимфоидных органах между крысами линии ГК и крысами Вистар [35]. Экспериментальные и эпидемиологические исследования убедительно доказывают связь между нарушениями циркадных ритмов и психоэмоциональными расстройствами [16, 17, 36]. Обнаруженные отличия в суточной активности у самок ГК делают актуальным дальнейшее изучение циркадных ритмов животных кататонической линии.

Таким образом, в данной работе показано, что при вскармливании в условиях отсутствия вмешательства в материнское окружение, самки линии ГК чаще находятся в гнезде и чаще кормят детенышей, чем самки крыс Вистар. Вероятно, эти особенности материнского поведения могут быть обусловлены большей тревожностью крыс кататонической линии ГК, чем контрольных животных. Обнаруженные различия в активности кормящих самок ГК в светлое и темное время суток позволяют предположить у них изменения циркадных ритмов.

Исследование выполнено при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0019. Содержание животных и все экспериментальные процедуры соответствовали международным биоэтическими нормами (Директива 2010/63/EU Европейского сообщества от 22 сентября 2010 г.). Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weaver I.C. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. Nature versus nurture: let's call the whole thing off // *Epigenetics*. 2007. Vol. 2. N 1. P. 22–28.
2. Curley J.P., Champagne F.A. Influence of maternal care on the developing brain: mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods // *Front. Neuroendocrin.* 2016. Vol. 40. P. 52–66.
3. Meaney M.J., Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? // *Trends Neurosci.* 2005. Vol. 28. N 9. P. 456–463.
4. Pena C.J., Champagne F.A. Implications of temporal variation in maternal care for the prediction of neurobiological and behavioral outcomes in offspring // *Behav. Neurosci.* 2013. Vol. 127. N 1. P. 33–46.
5. Kolpakov V.G., Kulikov A.V., Alekhina T.A., Chuguy V.F., Petrenko O.I., Barykina N.N. Catatonia or depression: the GC rat strain as an animal model of psychopathology // *Russ. J. Genet.* 2004. Vol. 40. N. 6. P. 672–678.
6. Kulikov A.V., Kolpakov V.G., Popova N.K. The genetic cataleptic (GK) rat strain as a model of depression disorders // V. Animal models in biological psychiatry, 1st edn. / Ed. A.V. Kalueff. N.Y.: Nova Science Pub. Inc., 2006. P. 59–73.
7. Fink M., Taylor M.A. The many varieties of catatonia // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2001. Vol. 251. Suppl. 1. P. 18–13.
8. Hornstein Ch., Trautmann-Villalba P., Hohm E., Rave E., Wortmann-Fleischer S., Schwarz M. Maternal bond and mother-child interaction in severe postpartum psychiatric disorder: Is there a link? // *Arch. Womens Ment. Health.* 2006. Vol. 9. N 5. P. 279–284.
9. Shenoy S., Desai G., Venkatasubramanian G., Chandra P.S. Parenting in mothers with schizophrenia and its relation to facial emotion recognition deficits- a case control study // *Asian J. Psychiatr.* 2019. Vol. 40. P. 55–59.
10. Khoshgoftar M., Khodabakhshi-Koolaee A., Reza Sheikhi M.R. Analysis of the early mother-child relationship

in schizophrenic patients // *Int. J. Soc. Psychiatry*. 2022. Vol. 68. N 3. P. 548–554.

11. Lavi-Avnon Y., Yadid G., Overstreet D.H., Weller A. Abnormal patterns of maternal behavior in genetic animal model of depression // *Physiol. Behav.* 2005. Vol. 84. N 4. P. 607–615.

12. Добрякова Ю.В., Танаева К.К., Дубынин В.А., Саркисова К.Ю. Сравнительный анализ проявлений материнской мотивации у крыс линий WAG/Rij и Wistar в тестах «предпочтение мест» и «открытое поле» // *Журн. высш. нерв. деят.* 2014. Т. 64. № 4. С. 448–459.

13. Саркисова К.Ю., Танаева К.К., Добрякова Ю.В. Условная реакция предпочтения места, ассоциированного с детенышами, и материнская забота у депрессивных крыс линии Wag/Rij // *Журн. высш. нерв. деят.* 2016. Т. 66. № 2. С. 229–241.

14. Petrenko O.I., Chuguy V.F. Barykna N.N., Alekhina T.A., Kolpakov V.G., Amstslavsky S.Ya. Components of early maternal environment affecting the predisposition to catalepsy // *Behav. Processes*. 2004. Vol. 65. N 1. P. 1–6.

15. Рязанова М.А., Прокудина О.И., Плектанчук В.С., Алехина Т.А. Экспрессия генов системы катехоламинов в среднем мозге и реакция престаимпульного торможения у крыс с генетической кататонией // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017. Т. 21. № 7. С. 798–803.

16. Karatsoreos I.N. Links between circadian rhythms and psychiatric disease // *Front. Behav. Neurosci.* 2014. Vol. 8: 162.

17. von Schantz M., Leocadio-Miguel M.A., McCarthy M.J., Papiol S., Landgraf D. Genomic perspectives on the circadian clock hypothesis of psychiatric disorders // *Advances in genetics*, vol. 107 / Ed. D. Kumar. Academic Press, 2021. P. 153–191.

18. Плюснина И.З., Таранцев И.Г., Булушев Е.Д., Коношенко М.Ю., Кожемякина Р.В., Гербек Ю.Э., Оськина И.Н. Анализ материнского поведения ручных и агрессивных серых крыс // *Журн. высш. нерв. деят.* 2013. Т. 63. № 3. С. 375–383.

19. August P.M., Santos Rodrigues Kd, Klein C.P., dos Santos B.G., Mattre C. Influence of gestational exercise practice and litter size reduction on maternal care // *Neurosci. Lett.* 2020. Vol. 741: 135454.

20. Myers M.M., Brunelli S.A., Squire J.M., Shindelacker R.D., Hofer M.A. Maternal behaviour of SHR rats and its relationship to offspring blood pressure // *Dev. Psychobiol.* 1989. Vol. 22. N 1. P. 29–53.

21. Bosch O.J., Pförtsch J., Beiderbeck D.I., Landgraf R., Neumann I.D. Maternal behaviour is associated with vasopressin release in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis in the rat // *J. Neuroendocrinol.* 2010. Vol. 22. N 5. P. 420–429.

22. Cohen L.J., Glover M.E., Pugh P.C., Fant A.D., Simmons R.K., Akil H., A. Kerman I.A., Clinton S.M. Maternal style selectively shapes amygdalar development and social behavior in rats genetically prone to high anxiety // *Dev. Neurosci.* 2015. Vol. 37. N 3. P. 203–214.

23. Bosch O.J. Maternal nurturing is dependent on her innate anxiety: the behavioral roles of brainoxytocin and vasopressin // *Horm. Behav.* 2011. Vol. 59. N 2. P. 202–212.

24. Bosch O.J., Neumann I.D. Brain vasopressin is an important regulator of maternal behavior independent of dams' trait anxiety // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. N 44. P. 17139–17144.

25. Kessler M.S., Bosch O.J., Bunck M., Landgraf R., Neumann I.D. Maternal care differs in mice bred for high versus low trait anxiety: impact of brain vasopressin and cross-fostering // *Soc. Neurosci.* 2011. Vol. 6. N 2. P. 156–168.

26. Boero G., Biggio F., Pisu M.G., Locci V., Porcu P., Serra M. Combined effect of gestational stress and postpartum stress on maternal care in rats // *Physiol. Behav.* 2018. Vol. 184. P. 172–178.

27. Olejnikova L., Polidarova L., Pauslyova L., Sladek M., Sumova A. Diverse development and higher sensitivity of the circadian clocks to changes in maternal-feeding regime in a rat model of cardio-metabolic disease // *Chronobiol. Int.* 2015. Vol. 32. N 4. P. 531–547.

28. Gao J., Nie L., Li Y., Li M. Serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors regulate rat maternal behavior through distinct behavioral and neural mechanisms // *Neuropharmacology*. 2020. Vol. 162: 107848

29. Серая крыса: Систематика. Экология. Регуляция численности. Ред. В.Е. Соколов и Е.В. Карасева. М.: Наука, 1990. 456 с.

30. Clinton S.M., Bedrosian T.A., Abraham A.D., Watson S.J., Akil H. Neural and environmental factors impacting maternal behavior differences in high- versus low-novelty-seeking rats // *Horm. Behav.* 2010. Vol. 57. N 4–5. P. 463–473.

31. Stern J.M. Trigeminal lesions and maternal behavior in Norway rats: II. Disruption of parturition // *Physiol. Behav.* 1996. Vol. 60. N 1. P. 187–190.

32. Kittrell E.M.W., Satinoff E. Diurnal rhythms of body temperature, drinking and activity over reproductive cycles // *Physiol. Behav.* 1988. Vol. 42. N 5. P. 477–484.

33. Fernandez J.W., Grizzell J.A., Philpot R.M., Wecker L. Postpartum depression in rats: Differences in swim test immobility, sucrose preference and nurturing behaviors // *Behav. Brain Res.* 2014. Vol. 272. P. 75–82.

34. Voitenko N.N., Kolpakov V.G., Popova N.K., Alekhina T.A. Predisposition to cataleptic reactions, monoamine oxidase and delta-sleep-inducing peptide in rats // *Biog. Amines*. 1995. Vol. 11. N 1. P. 63–76.

35. Panteleva N.G., Gryazeva N.I., Verbitskaya L.V., Shurlygina A.V., Trufakin V.A., Kolpakov V.G., Alekhina T.A., Barykina N.N. Diurnal variations in lymphocyte subpopulations in lymphoid organs of rats with genetic catalepsy and Wistar rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2004. Vol. 137. N 3. P. 288–290.

36. Lyall L.M., Wyse C.A., Graham N., et al. Association of disrupted circadian rhythmicity with mood disorders, subjective wellbeing, and cognitive function: A cross-sectional study of 91 105 participants from the UK biobank // *Lancet. Psychiat.* 2018. Vol. 5. N 6. P. 507–514.

Поступила в редакцию 12.04.2022

После доработки 12.05.2022

Принята в печать 25.05.2022

RESEARCH ARTICLE

A comparative study of dynamics of maternal behavior in Wistar rats and rats selected for predisposition to catatonic reactions (GC rats)**O.I. Prokudina** 

*Laboratory of Evolutionary Genetics, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
10 Lavrentyeva pr., Novosibirsk, 630090, Russia*

e-mail: petrenko@bionet.nsc.ru

Maternal behavior is an important factor for the offspring development in mammals. Particular traits of maternal behavior in the early ontogenesis may have a lasting effect on a number of behavioral and physiological parameters of offspring in their adulthood. In this study, we examined the maternal behavior of GC rats (GC stands for “genetic catatonics”) and control Wistar rats from the 1st to the 20th day after birth. Observations were carried out in a home cage during the day using an automated video recording system without the experimenter’s presence. GC female rats were found in the nest and nurse pups more often, as compared to the female Wistar rats. Wistar female rats “rested” outside the nest more often during the day, along with less frequent manipulations with nest material and less frequent self-grooming. The change in the frequency of maternal behavior patterns as the offspring matures has similar dynamics in both rat strains. When comparing activity in the light and dark phases of the light/dark cycle, we found that GC females had a greater activity outside the nest at night. We assume that distinguished maternal behavior of catatonic rats may be due to greater anxiety in GC rats, as compared to control rats.

Keywords: *maternal behavior, catalepsy, catatonia, GC rat strain, circadian rhythm, animal model*

Funding: The research was funded by budget number FWNR-2022-0019.

Сведения об авторах

Прокудина Ольга Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории эволюционной генетики ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-63; e-mail: petrenko@bionet.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2168-8989>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Оценка спектра протеолитической активности микромицетов рода *Aspergillus* по отношению к белкам системы гемостаза

А.А. Осмоловский^{1, *} , Б. Шаш³, А.В. Александрова²,
Н.А. Баранова¹, В.Г. Крейер¹

¹Кафедра микробиологии и ²кафедра микологии и альгологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Natural Sciences and Literature, Istanbul Kültür University,
Ataköy 7-8-9-10, E5 Karayolu Üzeri Ataköy Yerleşkesi, Bakırköy, 34158, Istanbul, Turkey

*e-mail: aosmol@mail.ru

Изучена активность внеклеточных протеиназ у семи штаммов разных видов микромицетов рода *Aspergillus* по отношению к белкам системы гемостаза. Сравнение значений энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином с последующим их глубинным культивированием и анализом амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами протеиназ системы гемостаза позволило отобрать штаммы *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 в качестве перспективных продуцентов фибринолитических протеиназ. Образованные обоими штаммами протеиназы оказались способны расщеплять хромогенные пептидные субстраты тромбина, плазмينا, фактора X, протеина C и урокиназы, проявляя высокую плазминоподобную и тромбиноподобную активность и не обладая активаторным действием к проферментам системы гемостаза.

Ключевые слова: протеиназы микромицетов, фибринолитические ферменты, тромболитические средства, плазминоподобная активность, активаторы белков гемостаза, хромогенные пептидные субстраты

Микроскопические грибы, относящиеся к роду *Aspergillus*, протеолитически активны в отношении самых разных белковых субстратов и выделяются из самых разнообразных мест обитания [1–5]. Широко проводятся исследования по воздействию секретируемых аспергиллами протеиназ на различные белки системы гемостаза, прежде всего – фибрин, фибриноген и плазминоген – для разработки препаратов тромболитического действия [6–9]. Известно, что протеиназы некоторых микромицетов способны не только расщеплять эти белки, но и проводить ограниченный протеолиз плазминогена, проявляя таким образом активаторное действие [10–12]. У представителей рода *Aspergillus* активаторная активность была показана ранее по отношению к другим белкам системы гемостаза – протеину C (протеиназа *A. ochraceus*), фактору X (протеиназа *A. ochraceus*) и прекалликреину (протеиназа *A. terreus*) [13–15]. Проявление подобной активности делает возможным применение этих протеиназ в лабораторных диагностических целях для определения с их помощью концентрации белков-проферментов в кровотоке, недостаток

которых приводит к риску возникновения тромбозно-оболочечных заболеваний [16].

Единичные исследования, направленные на изучение активаторной по отношению к белкам системы гемостаза активности среди протеиназ микромицетов, не позволяют в полной мере получить представление о ее распространенности среди аспергиллов. Показано, что не все представители *Aspergillus*, изученные ранее, обладают протеиназами с такой активностью [13, 17, 18]. В этой связи поиск новых продуцентов протеиназ – активаторов белков системы гемостаза и оценка их воздействия на ключевые белки гемостаза представляют значительный интерес. Целью настоящей работы стало изучение воздействия внеклеточных протеиназ микромицетов рода *Aspergillus* на белки системы гемостаза.

Материалы и методы

Объекты исследования и их поддержание. Объектами исследования служили штаммы микромицетов *Aspergillus aculeatus* A2, *A. candidus* A4, *A. chevalieri* 1205, *A. crustosus* A29, *A. janus* A17, *A. raperi* A13 и *A. unguis* 2167 из коллекции кафе-

дры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова. Поддержание штаммов осуществляли в пробирках на скошенных средах Чапека-Докса и сусло-агаре (3°Б). В качестве посевного материала использовали культуры, выращенные в течение 7 сут.

Определение протеолитического потенциала микромицетов. Проявление протеолитической активности определяли при росте штаммов в чашках Петри на средах состава (в %): KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,025, пептон — 0,5, казеин или бычий фибрин — 1,0, агар — 1,5. Культивирование проводили в течение 5 сут при температуре 28 °С. Выявление зон гидролиза осуществляли после добавления в чашки Петри реактива Кумасси бриллиантового голубого G-250 с хлорной кислотой. Протеолитический потенциал микромицетов определяли по значению энзиматического индекса, рассчитанного как соотношение диаметров (в мм) колонии с зоной гидролиза и колонии без нее [19].

Условия культивирования и определение протеолитической активности. Культивирование микромицетов проводили в глубинных условиях в шейкере-инкубаторе ES-20/80 (BioSan, Латвия) при 200 об./мин в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28 °С в течение 2 сут на среде с суслом, глюкозой и пептоном [19, 20], после чего часть полученного посевного материала переносили в среду состава (в %): глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO_3 — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05, pH 5,5, с последующим культивированием в течение 4 сут.

Активность внеклеточных протеиназ определяли в фильтрате культуральной жидкости с хромогенными пептидными и белковыми субстратами.

В качестве хромогенных пептидных субстратов использовали H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S2251) — для определения плазмина, Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S2765) и Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) — для определения Ха-фактора плазмы крови человека, Glp-Pro-Arg-pNA (S2366) — для определения активированного протеина C, Glp-Gly-Arg-pNA (S2444) — для определения урокиназы, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238) — для определения тромбина [21]. Для проведения реакции к 200 мкл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 0,05%-ного (в 0,05М Трис-HCl-буфере, pH 8,2) раствора соответствующего субстрата (прямая активность) или прединкубировали ее с плазмой крови человека с последующим добавлением субстрата (активаторная активность) в случае отсутствия прямой активности, как описано ранее [13]. За единицу активности (Е) принимали количество мкмоль п-нитроанилина, отщепившегося от хромогенного субстрата за 1 мин.

Реакции проводили при постоянном перемешивании при 37 °С в термошейкере TS-100 (BioSan, Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре BioSpectrometer® kinetic (Eppendorf, Германия).

Плазминоподобную активность (на прогретых фибриновых пластинах) и активность активаторов пламиногена (на непрогретых фибриновых пластинах) определяли по модифицированному методу Аструпа—Мюллертца—Лансена и выражали в условных единицах на 1 мл культуральной жидкости [22]. Инкубацию фибриновых пластинок с нанесенными образцами фильтрата культуральной жидкости микромицетов проводили в течение 3 ч. Активность выражали в усл. ед./мл.

Определение содержания белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорда [23]. Для этого к 50 мкл пробы добавляли 950 мкл реактива Кумасси бриллиантового голубого G-250. Оптическую плотность определяли при 595 нм.

Эксперименты выполнены в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ MS Excel 2013 и Statistica 7.0. Для сравнения данных использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде среднего значения с ошибкой среднего.

Результаты и их обсуждение

Изученные штаммы микромицетов выделены из образцов лесной подстилки Центрально-Лесного государственного биосферного заповедника и Кроноцкого заповедника (Россия), листового опада национальных парков Чуянгсин и Катъен (Вьетнам), а также почвы Богдинско-Баскунчакского заповедника (Россия).

Как известно, одним из способов оценки протеолитического потенциала микромицетов является их посев на агаризованные среды с белковыми субстратами с последующим расчетом энзиматического индекса — показателя относительной продуктивности микроорганизмов, определяемого как соотношение диаметров колонии с зоной гидролиза субстрата в среде к диаметру колонии. Чем это соотношение выше, тем более активен изучаемый штамм. Сравнение энзиматических индексов одного и того же штамма, выросшего на средах с разными белковыми субстратами, позволяет судить о выраженности действия образуемых им протеиназ и вести поиск продуцентов протеиназ с доминированием определенной активности [19]. Так, все семь изученных штаммов аспергиллов разных видов были протеолитически активными, однако величины энзиматических индексов варьировали от 1,0 до 1,7. Полученные данные представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, наибольший энзиматический индекс на среде

с казеином и на среде с фибрином был обнаружен у микромицета *A. candidus* A4 — как при росте на среде с казеином (1,714), так и при росте на среде с фибрином (1,410). Наименьший энзиматический индекс при росте на среде с казеином был показан для *A. chevalieri* 1205 (1,070), на среде с фибрином — для *A. aculeatus* A2 (1,000). Проявление казеинолитической и фибринолитической активности у всех микромицетов коррелировало, при этом значения энзиматических индексов на агаризованной среде с казеином были в 1,15–1,3 раза выше, чем на среде с фибрином. Видимо, протеиназы изученных микромицетов могут расщеплять глобулярные белки более активно, чем фибриллярные.

Изучение спектра действия образуемых микромицетами протеиназ проводили в реакциях со специфическими хромогенными субстратами белков системы гемостаза при глубинном культивировании штаммов. В табл. 2 показаны результаты определения прямой и активаторной по отношению к белкам системы гемостаза активности внеклеточных протеиназ изученных аспергиллов.

Как показали полученные результаты, большинство культур обладали способностью гидролизовать все использованные субстраты, что может говорить об их широкой субстратной специфичности, значения активности варьировали от 2,6 до 70,3 Е/мл $\times 10^{-3}$. Наиболее активными по отношению к субстратам — пара-нитроанилидам — оказались культуры *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29, наименьшую активность продемонстрировал *A. unguis* 2167. Наибольшая амидолитическая активность была выявлена по отношению к субстратам тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) и плазмину (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), наименьшая — к субстрату X фактора (Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA). Максимальную плазминоподобную активность (с субстратом H-D-Val-Leu-Lys-pNA) обнаружили у *A. candidus* A4 (62,3 Е/мл $\times 10^{-3}$) и *A. chevalieri* 1205 (26,4 Е/мл $\times 10^{-3}$), тромбиноподобную (с субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) — у *A. crustosus* A29 (56,2 Е/мл $\times 10^{-3}$) и *A. janus* A17 (43,9 Е/мл $\times 10^{-3}$). Внеклеточные протеиназы, образуемые двумя штаммами из семи — *A. aculeatus*

A2 и *A. janus* A17 — оказались неспособными расщеплять субстрат тромбина H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (табл. 2).

Преобладания какой-либо одной из исследованных амидолитической активности у изученных микромицетов выявить не удалось. Кроме того, у четырёх штаммов аспергиллов не было обнаружено активаторной активности по отношению ни к одному из факторов свертывания крови в сопряженных реакциях с плазмой крови человека. Остальные три штамма обладали активаторной к протромбину активностью (*A. aculeatus* A2, *A. janus* A17, *A. unguis* 2167) и фактору X (*A. janus* A17). Наибольшая активаторная активность была обнаружена к протромбину с субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA; ее проявили протеиназы *A. unguis* 2167 (17,6 Е/мл $\times 10^{-3}$). Величины активности не позволяют считать эти микромицеты продуцентами протеиназ — активаторов белков системы гемостаза, т.к. они оказались в несколько раз меньше, чем у подобных известных штаммов — *A. ochraceus* L-1 и *A. terreus* 2 [13–15].

Из всех изученных штаммов наибольший интерес представляли микромицеты *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 как наиболее протеолитически активные. Ввиду способности секретируемых протеиназ микромицетов проявлять плазминоподобную активность дополнительно было изучено их фибринолитическое действие на фибриновых пластинах — как прямое, так и активаторное. Значения фибринолитической активности представлены на рисунке и оказались близки (175,2 и 186,5 усл.ед./мл для *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 соответственно). Величины активности были сопоставимы с величинами активности для других аспергиллов — *A. ochraceus* L-1, *A. versicolor* 1 [22] и *Purpureocillium lilacinum* k1 [18]. Высокие значения удельной фибринолитической активности, более 10000 усл. ед./мг белка, свидетельствуют о возможности практического применения внеклеточных протеиназ *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29 в биомедицине (рисунок). Активаторной к плазминогену активности у изученных штаммов выявлено не было.

Таблица 1

Протеолитический потенциал аспергиллов при росте на агаризованных средах с казеином и фибрином (указаны средние и ошибки среднего)

Микромицет	Среда с казеином		Среда с фибрином		Энзиматический индекс	
	Диаметр колонии, мм	Диаметр зоны гидролиза, мм	Диаметр колонии, мм	Диаметр зоны гидролиза, мм	Среда с казеином	Среда с фибрином
<i>A. aculeatus</i> A2	27 ± 1	34 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	1,260 ± 0,05	1,000 ± 0,05
<i>A. candidus</i> A4	21 ± 1	36 ± 1	22 ± 1	31 ± 1	1,714 ± 0,05	1,410 ± 0,05
<i>A. chevalieri</i> 1205	57 ± 1	61 ± 1	16 ± 1	19 ± 1	1,070 ± 0,05	1,187 ± 0,05
<i>A. crustosus</i> A29	19 ± 1	30 ± 1	19 ± 1	26 ± 1	1,578 ± 0,05	1,368 ± 0,05
<i>A. janus</i> A17	15 ± 1	21 ± 1	13 ± 1	17 ± 1	1,400 ± 0,05	1,307 ± 0,05
<i>A. raperi</i> A13	15 ± 1	19 ± 1	24 ± 1	29 ± 1	1,267 ± 0,05	1,208 ± 0,05
<i>A. unguis</i> 2167	11 ± 1	16 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	1,455 ± 0,05	1,166 ± 0,05

Таблица 2

Прямая и активаторная по отношению к белкам системы гемостаза активность внеклеточных протеиназ аспергиллов

Микромицет	Активность с хромогенными пептидными субстратами, Е/мл × 10 ⁻³ (указаны средние и ошибки среднего)													
	Tos-Gly-Pro-Arg-pNA		H-D-Phe-Pip-Arg-pNA		H-D-Val-Leu-Lys-pNA		Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA		Bz-Ile-Glu(OR)-Gly-Arg-pNA		pGlu-Pro-Arg-pNA		pGlu-Gly-Arg-pNA	
	- плазма*	+ плазма**	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма	- плазма	+ плазма
<i>A. aculeatus</i> A2	8,6 ± 0,2	0	0	5,5 ± 0,05	10,0 ± 0,05	-	7,9 ± 0,05	-	7,1 ± 0,05	0	7,6 ± 0,05	0	9,9 ± 0,05	-
<i>A. candidus</i> A4	21,3 ± 0,05	***	16,7 ± 0,05	-	62,3 ± 0,05	-	15,4 ± 0,05	-	9,8 ± 0,05	-	16,4 ± 0,05	-	17,6 ± 0,05	-
<i>A. chevalieri</i> 1205	14,6 ± 0,05	-	27,5 ± 0,05	-	23,8 ± 0,05	-	14,2 ± 0,05	-	9,8 ± 0,05	-	9,3 ± 0,05	-	6,2 ± 0,05	0
<i>A. crustosus</i> A29	56,2 ± 0,05	-	17,3 ± 0,05	-	26,4 ± 0,05	-	70,3 ± 0,05	-	7,9 ± 0,05	0	67,2 ± 0,05	-	17,8 ± 0,05	-
<i>A. janus</i> A17	43,9 ± 0,05	-	0 ± 0,05	13,4 ± 0,05	6,6 ± 0,05	-	22,0 ± 0,05	-	3,5 ± 0,05	16,1	34,6 ± 0,05	-	16,0 ± 0,05	-
<i>A. raperi</i> A13	16,1 ± 0,05	-	15,4 ± 0,05	-	6,0 ± 0,05	-	32,7 ± 0,05	-	11,2 ± 0,05	-	29,5 ± 0,05	-	10,0 ± 0,05	-
<i>A. unguis</i> 2167	4,0 ± 0,05	17,6 ± 0,05	7,0 ± 0,05	-	3,9 ± 0,05	8,52 ± 0,05	8,6 ± 0,05	-	9,3 ± 0,05	-	2,6 ± 0,05	12,9 ± 0,05	8,5 ± 0,05	-

* прямая активность с хромогенными субстратами
** активаторная активность с хромогенными субстратами
*** активность не определяли

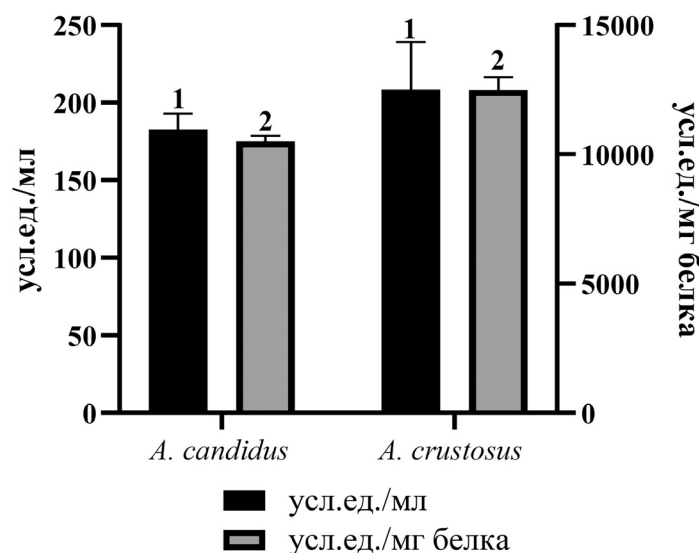


Рисунок. Общая (1) и удельная (2) фибринолитическая активность протеиназ, образуемых *A. candidus* A4 и *A. crustosus* A29.

Таким образом, изучена активность внеклеточных протеиназ у семи штаммов разных видов микромицетов рода *Aspergillus* по отношению к белкам системы гемостаза. Сравнение значений энзиматических индексов при росте штаммов на агаризованных средах с казеином и фибрином с последующим их глубинным культивированием и анализом амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами протеиназ системы гемостаза позволило отобрать штаммы

A. candidus A4 и *A. crustosus* A29 в качестве перспективных продуцентов фибринолитических протеиназ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4. Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abdal-Aziz S.A.A., Ali S.M.* Molecular characterization and differentiation of proteases isolated from different *Aspergillus* fungal species // Online J. Biol. Sci. 2021. Vol. 21. N 1. P. 69–119.
2. *Galiakberova A.A., Bednenko D.M., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A., Egorov N.S.* Formation and properties of the extracellular proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 micromycete active against fibrillar proteins // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57. N 5. P. 586–593.
3. *Mustefa Beyan, S., Venkatesa Prabhu, S., Mumecha, T.K., Gameda Mesfin T.* Production of alkaline proteases using *Aspergillus* sp. isolated from Injera: RSM-GA based process optimization and enzyme kinetics aspect // Curr. Microbiol. 2021. Vol. 78. N 5. P. 1823–1834.
4. *Popova E.A., Kreyer V.G., Komarevtsev S.K., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A.* Properties of extracellular proteinase of the micromycete *Aspergillus ustus* 1 and its high activity during fibrillary-protein hydrolysis // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57. N 2. P. 200–205.
5. *Chung D., Yu W.-J., Lim J.-Y., Kang N.-S., Kwon Y.-M., Choi G., Bae S.-S., Cho K., Lee D.-S.* Characterization of the proteolytic activity of a halophilic *Aspergillus reticulatus* strain SK1-1 isolated from a solar saltern // Microorganisms. 2022. Vol. 10. N 1: 29.
6. *Diwan D., Usmani Z., Sharma M., Nelson J.W., Thakur V.K., Christie G., Molina G., Gupta V.K.* Thrombolytic enzymes of microbial origin: a review // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. N 19: 10468.
7. *Moula Ali A.M., Bavisetty S.C.B.* Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review // Int. J. Biol. Macromol. 2020. Vol. 163. P. 1498–1517.
8. *Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С.* Протеолитические ферменты мицелиальных грибов с плазминоподобной и активатором к плазминогену активностью // Усп. совр. биол. 2021. Т. 141. № 5. С. 467–482.
9. *Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R.* Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterization and prodigious biopharmaceutical applications // Pharmaceuticals. 2021. Vol. 13. N 11: 1880.
10. *Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S.* Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
11. *Fokichev N.S., Kornienko E.I., Sharkova T.S., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A.* Thrombolytic activity and properties of the proteinase produced by the micromycete *Tolypocladium inflatum* k1 // Mycol. Phytopathol. 2021. Vol. 55. N 6. P. 449–456.

12. Kornienko E.I., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Characteristics and properties of the complex of proteolytic enzymes of the thrombolytic action of the micromycete *Sarocladium strictum* // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. Vol. 57. N 1. P. 57–64.
13. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. Vol. 40. N 6. P. 634–639.
14. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Identification of targets for extracellular proteases activating proteins of the haemostatic system produced by micromycetes *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus terreus* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. N 5. P. 500–505.
15. Zvonareva E.S., Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kotova I.B., Egorov N.S. Production of proteinase with plasmin-like and prekallikrein activating activity by the micromycete *Aspergillus terreus* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. Vol. 54. N 2. P. 206–210.
16. Marlar R.A., Gausman J.N. Laboratory testing issues for protein C, protein S, and antithrombin // Int. J. Lab. Hematol. 2014. Vol. 36. N 3. P. 289–295.
17. Osmolovskiy A.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Piskunkova N.F., Egorov N.S. Micromycetes *Aspergillus flavus* and *A. oryzae* as producers of proteinases activating the proteins of human hemostasis system // Mycol. Phytopathol. 2019. Vol. 53. N 3. P. 183–185.
18. Lukianova A.A., Kornienko E.I., Vigand P.A., Kreyer V.G., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A. Secretion by micromycetes of proteases with activity similar to the activity of the hemostatic system proteins // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2020. Vol. 75. N 1. P. 31–35.
19. Osmolovskiy A.A., Rukavitsyna E.D., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Production of proteinases with fibrinolytic and fibrinogenolytic activity by a micromycete *Aspergillus ochraceus* // Microbiology. 2017. Vol. 86. N 4. P. 512–516.
20. Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities // Microbiology. 2001. Vol. 70. N 5. P. 519–522.
21. Proteolytic Enzymes. A practical approach / Eds. R. Beynon and J.S. Bond. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 340 pp.
22. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.
23. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. N 1–2. P. 248–254.

Поступила в редакцию 09.04.2022

После доработки 12.05.2022

Принята в печать 23.05.2022

SHORT COMMUNICATION

Evaluation of the spectrum of proteolytic activity of micromycetes of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system

A.A. Osmolovsky^{1, *} , B. Şaş³, A.V. Aleksandrova², N.A. Baranova¹, V.G. Kreyer¹

¹Department of Microbiology and ²Department of Mycology and Algology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

³Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Natural Sciences and Literature, Istanbul Kültür University, Ataköy 7-8-9-10, E5 Karayolu Üzeri Ataköy Yerleşkesi, Bakırköy, 34158, Istanbul, Turkey

*e-mail: aosmol@mail.ru

The activity of extracellular proteinases in seven strains of different species of micromycetes of the genus *Aspergillus* in relation to proteins of the hemostasis system was studied. Comparison of the values of enzymatic indices during the growth of strains on agar media with casein and fibrin, followed by their submerged cultivation and analysis of amidolytic activity with chromogenic peptide substrates of proteinases of the hemostasis system, made it possible to select strains of *A. candidus* A4 and *A. crustosus* A29 as promising producers of fibrinolytic proteinases. The proteinases formed by both strains were able to cleave the chromogenic peptide substrates of thrombin, plasmin, factor X, protein C, and urokinase, exhibiting high plasmin-like and thrombin-like activity and not having an activating effect on the proenzymes of the hemostasis system.

Keywords: micromycete proteinases, fibrinolytic enzymes, thrombolytic agents, plasmin-like activity, hemostasis protein activators, chromogenic peptide substrates

Funding: The work was supported by the Financial Council for Grants of the President of the Russian Federation No. SP-3906.2021.4.

Сведения об авторах

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru; ORCID: 0000-0001-6672-0551

Шаш Бегюм (Şaş Begüm) — студент кафедры молекулярной биологии и генетики, факультет естественных наук и литературы, Стамбульский университет Кюльтюр. Тел.: +90 542 747 61 10; e-mail: begum.sas99@gmail.com

Александрова Алина Витальевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: alina-alex2011@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: baranovana2012@mail.ru

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

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. 2022. Т. 77. № 2

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 A4). 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) **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.*

5) **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., Алексеев 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.

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: 10.02.2022).

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](#)