

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 77 • № 3 • 2022 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Моргунова Г.В., Хохлов А.Н. Признаки сходства и различия
клеточных моделей старения. Обзор предметного поля 151

Оригинальные исследования

- Кривина Е.С., Темралеева А.Д. Морфологический
и молекулярно-генетический анализ штаммов зеленых микроводорослей,
выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы» . . . 160
- Ерохина М.В., Павлова Е.Н., Тарасова Е.К., Курынина А.В.,
Поташникова Д.М., Лепеха Л.Н., Эргешов А.Э., Онищенко Г.Е.
Наночастицы полимера молочной кислоты с рифампицином снижают
активность мультитекарственного транспортера Р-гр в макрофагах человека . . 166
- Филатова Т.С., Абрамочкин Д.В. Характеристики быстрого натриевого тока
в изолированных кардиомиоцитах перепела 173
- Маторин Д.Н., Тодоренко Д.А., Воронов Д.А., Горячев С.Н.,
Братковская Л.Б., Краснова Е.Д. Особенности распределения и состояния
фитопланктона на разных глубинах в озере Кисло-Сладкое Белого моря 180
- Динариева Т.Ю., Клишко А.И., Чердынцева Т.А., Брюханов А.Л.,
Нетрусов А.И. Витамин К₂ является медиатором транспорта электронов
от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинооксидазе *bd*-типа у *Lactocaseibacillus rhamnosus*
КМ МГУ 529 188
- Тиморшина С.Н., Попова Е.А., Галиакберова А.А., Очнева А.Г.,
Осмоловский А.А. Протеолитические ферменты микромицетов рода
Aspergillus, гидролизующие фибриллярные белки, для биомедицины
и биотехнологических процессов 195
- Челомбитко М.А., Галкин И.И., Плетюшкина О.Ю., Зиновкин Р.А.,
Попова Е.Н. Влияние антиоксидантов на продукцию хемокина MCP-1
клетками линии EA.hy926 в ответ на IL-6 201

CONTENTS

Reviews

- Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Signs of similarities and differences
in cellular models of aging. A scoping review 151

Research articles

- Krivina E.S., Temraleeva A.D. Morphological and molecular genetic analysis
of green microalgal strains isolated from commercial biological products
based on “living Chlorella”. 160
- Erokhina M.V., Pavlova E.N., Tarasova E.K., Kurygina A.V.,
Potashnikova D.M., Lepekha L.N., Ergeshov A.E., Onishchenko G.E.
Nanoparticles of lactic acid polymer with rifampicin decrease activity
of multi-drug transporter P-gp in human macrophages 166
- Filatova T.S., Abramochkin D.V. Characteristics of fast sodium current
in isolated quail cardiomyocytes 173
- Matorin D.N., Todorenko D.A., Voronov D.A., Goryachev S.N.,
Bratkovskaya L.B., Krasnova E.D. Features of the distribution and condition
of phytoplankton at different depths in the Kislo-Sladkoe Lake partly isolated
from the White Sea 180
- Dinarieva T.Yu., Klimko A.I., Cherdynseva T.A., Bryukhanov A.L.,
Netrusov A.I. Vitamin K2 mediates electron transport from NADH
dehydrogenase 2 to *bd*-type quinol oxidase in *Lactocaseibacillus rhamnosus*
CM MSU 529. 188
- Timorshina S.N., Popova E.A., Galiakberova A.A., Ochneva A.G.,
Osmolovskiy A.A. *Aspergillus* proteolytic enzymes hydrolyzing fibrillar proteins
for biomedicine and biotechnological process 195
- Chelombitko M.A., Galkin I.I., Pletjushkina O.Yu., Zinovkin R.A.,
Popova E.N. Effect of antioxidants on the production of MCP-1 chemokine
by EA.hy926 cells in response to IL-6. 201

ОБЗОР

УДК 57.017.67:576.53

Признаки сходства и различия клеточных моделей старения. Обзор предметного поля

Г.В. Моргунова^{*} , А.Н. Хохлов 

Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

^{*}e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Несмотря на большой интерес ученых к вопросу о том, что является старением клеток, и длительную историю его изучения, в этой области до сих пор существует много противоречий. Они возникают из-за того, что было разработано несколько разных подходов к моделированию старения *in vitro*. В результате возникли даже разные термины — «одряхление» клеток (*cell senescence*) и старение клеток (*cell aging*). У моделей для изучения старения на клеточном уровне есть не только различия, но и общие черты. Более того, в настоящее время становится очевидным, что одни модели дополняют другие. Об этом свидетельствует, в частности, тот факт, что биомаркеры, применяемые в рамках одной модели, оказываются пригодными для использования и в другой (ассоциированная со старением β -галактозидаза, липофусцин и др.). Развитие подходов к изучению клеточного старения происходило неравномерно, и в настоящее время исследования, посвященные этой теме, переживают очередной подъем в связи с перспективностью применения сенолитиков (препаратов, избирательно устраняющих «сенесцентные» клетки) для увеличения продолжительности жизни многоклеточных организмов. В настоящем обзоре рассмотрены плюсы и минусы разных моделей для изучения старения на культивируемых клетках различной природы.

Ключевые слова: старение, клеточные культуры, биомаркеры старения, цитогеронтология, репликативное старение, хронологическое старение

Исследования, посвященные изучению старения клеток, были начаты еще во втором десятилетии XX в. [1]. Несмотря на давнюю историю и большой интерес ученых к этой области до сих пор существует много противоречий в вопросе о том, что является «старением клеток». Основная масса накопленных данных была получена в ходе исследований *in vitro*, акцент в последнее время смещается в сторону экспериментальных работ, посвященных старению клеток *in vivo*. В рамках подхода *in vitro* существует несколько моделей для изучения старения на клеточном уровне. Само понятие «старение клеток» — в зависимости от того, какую мы рассматриваем модель — тоже существует в двух формах: как *cell senescence*, или «одряхление» клеток, и как *cell aging*, или старение клеток в том понимании, в котором оно существует для многоклеточных стареющих организмов — т.е. увеличение вероятности гибели со временем. Хотя разные подходы и модели служат разным целям, они тесно связаны друг с другом.

История изучения старения клеток *in vitro*

Изучение старения клеток *in vitro* является областью цитогеронтологии. Термин «цитогеронтология» появился в ходе экспериментов Леонарда Хейфлика, однако первым обратил внимание на

вопрос о смертности и бессмертии клеток Август Вейсман в конце XIX в. [2, 3]. Вейсман был первым, кто отметил существенное различие между клетками бессмертной зародышевой линии и соматическими клетками, которые стареют и умирают (смертная сома и бессмертная «зародышевая плазма» — Keimplasma) [4].

Экспериментальные основы цитогеронтологии были заложены в начале XX в. Алексисом Каррелем [5, 6]. Он был первым, кто изучил, будут ли соматические клетки, полученные от высших животных, «стареть» и умирать или же они могут размножаться бесконечно. С этой целью Каррель разработал процедуру культивирования эпителиальных или фибробластоподобных клеток в специальных флаконах, которая до сих пор используется в современных лабораториях с небольшими модификациями. Однако результаты его экспериментов не соответствовали концепции «смертной сомы», так как некоторые клеточные штаммы, полученные из куриных эмбрионов, могли поддерживаться почти бесконечно без каких-либо признаков деградации.

После экспериментов Карреля геронтологи почти полвека считали, что соматические клетки способны к неограниченной репликации, пока исследования, проведенные в 1950-х и 1960-х гг.

Свимом и Паркером [7], а также Хейфликом [8, 9] не показали, что полученные Каррелем результаты были, вероятно, артефактом. Оказалось, что почти все нормальные клетки животных обладают ограниченным пролиферативным потенциалом и способны поделиться в культуре не более 100–120 раз (т.е. пройти около 50 удвоений клеточной популяции). Термин «цитогеронтология» был введен Хейфликом для описания научного направления, занимающегося изучением «возрастных» изменений в культурах нормальных клеток по мере истощения ими своего пролиферативного потенциала (максимального числа удвоений клеточной популяции) [10, 11]. Так возникла модель репликативного старения, или «старения по Хейфлику» (рисунок). Однако позже термин стали использовать для любых исследований механизмов старения в экспериментах на клеточных культурах.

Модели для изучения старения *in vitro*

Модель, основанная на лимите Хейфлика, не имеет прямого отношения к механизмам старения [12–14]. Причина ограниченности митотического потенциала заключается в укорочении с каждым делением клетки ее теломер [15, 16]. Долгое время под старением клеток понимали именно репликативное старение. Некоторое время после его открытия была распространена идея о том, что лимит Хейфлика лежит в основе старения организма. Интерес к феномену поддерживало обнаружение некоторых корреляций – например, снижение митотического потенциала фибробластов у пациентов с прогерией, прямая связь этого параметра с продолжительностью жизни вида или его обратная связь с возрастом донора клеток. Однако данный феномен не дает ответа на

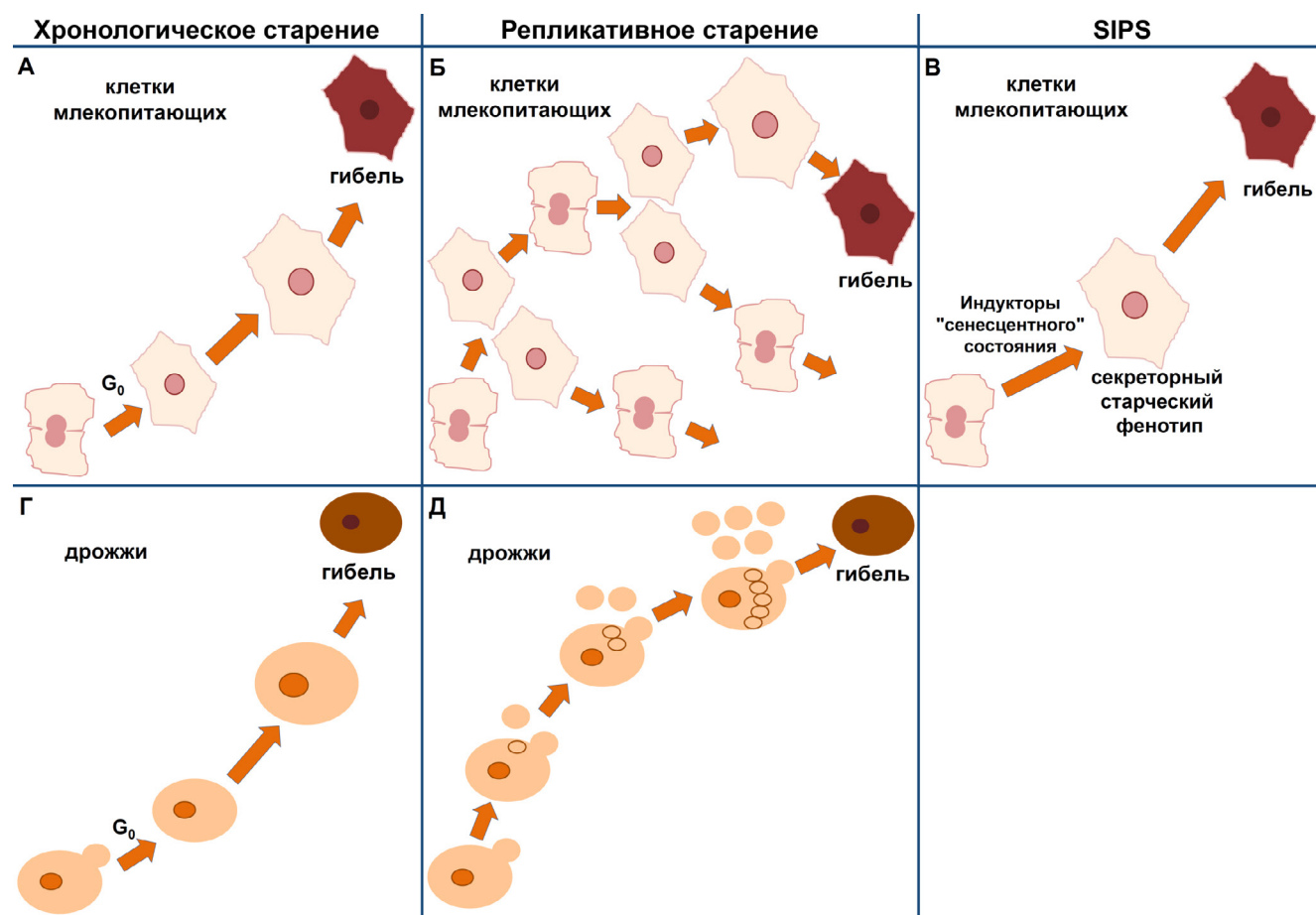


Рисунок. Основные модели старения клеток. **А** – «стационарное», или хронологическое, старение клеток млекопитающих, включая человека. Клетки гибнут через некоторое время после остановки пролиферации, происходящей из-за метаболических перестроек и/или контактного торможения (quiescence). Клеточное старение – в значении cell aging, т.к. со временем увеличивается вероятность гибели клеток в культуре. **Б** – репликативное старение клеток млекопитающих (в том числе – человека), или старение, основанное на феномене Хейфлика. Клетки претерпевают изменения с каждым пассажем – удвоением клеточной популяции. Достигая лимита Хейфлика (терминального укорочения теломер), они перестают делиться и через некоторое время гибнут. **В** – стресс-индуцированное преждевременное старение (stress-induced premature senescence, SIPS). На клетки воздействуют факторами, индуцирующими «сенесцентное» состояние, клетки приобретают секреторный старческий фенотип. «Сенесцентные» клетки не могут делиться, накапливают биомаркеры старения и гибнут через некоторое время. Для **Б** и **В** клеточное старение – в значении cell senescence, т.к. клетки на поздних пассажах или под воздействием повреждающих факторов становятся «сенесцентными». Однако это не отменяет того, что вероятность их гибели может увеличиваться со временем. **Г** – хронологическое старение дрожжей. Клетки дрожжей перестают делиться в стационарной фазе роста, со временем приобретают возрастные изменения и гибнут. **Д** – репликативное старение дрожжей. «Молодые» клетки отпочковываются от материнской клетки дрожжей, при этом поврежденные органеллы и молекулы остаются в материнской клетке.

вопрос о том, почему мы стареем, так как клетки в организме, как правило, не исчерпывают полностью свой митотический потенциал — даже у пожилых людей [13, 17]. Кроме того, данная модель никак не объясняет старение постмитотических и специализированных клеток, а также стволовых клеток, имеющих активную теломеразу. Не исключено, что если бы продолжительность жизни человека была увеличена в несколько раз, некоторые клеточные популяции в конечном итоге исчерпывали бы свой митотический потенциал (тем самым достигая лимита Хейфлика), что могло бы привести ко «второй волне» старения. Некоторые исследователи все же придерживаются мнения о том, что укорочение теломер в клетках является важным фактором старения и долголетия. В частности, существует определенный репликативный «мозаицизм» клеток, наблюдаемый в высокоорганизованном многоклеточном организме [18].

Еще одним существенным недостатком модели Хейфлика является то, что в исследованиях довольно трудно правильно проводить повторные эксперименты с одним и тем же клеточным штаммом, потому что клетки непрерывно меняются от пассажа к пассажу. Однако модель репликативного старения применима не только к нормальным клеткам млекопитающих, но в несколько модифицированном виде — и к дрожжам (рисунок). В основе репликативного старения дрожжей лежит не лимит Хейфлика, а феномен ограниченного количества дочерних клеток, которое может дать одна материнская [19]. В отличие от ситуации с культивируемыми клетками человека и животных, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дочерняя клетка (она обычно гораздо меньше материнской) образуется в результате асимметричного почкования. При этом материнская клетка теряет способность к такому почкованию через определенное количество делений, после чего претерпевает деградацию и гибель, а дочерние «рождаются молодыми». Этот процесс похож на старение пула стволовых клеток у высших организмов [20]. Однако репликативное старение не выявляется у некоторых видов дрожжей, например, у *Schizosaccharomyces pombe* [21].

Клетки, «состарившиеся» в соответствии с феноменом Хейфлика, в англоязычной литературе называют senescent cells. В настоящее время на данной модели продолжают работать многочисленные лаборатории, однако исследователи теперь часто используют модифицированный вариант репликативного старения — стресс-индуцированное преждевременное старение (stress-induced premature senescence, SIPS). В экспериментах с SIPS клетки специально приводят к «сенесцентному» состоянию, повреждая их путем воздействия химических или физических факторов (ионизирующее излучение, окислительный стресс, митомицин C, доксорубин, этанол, и т.д.), чтобы они не могли де-

литься [22–27]. Вследствие такого воздействия клетки приобретают «старческий» секреторный фенотип (senescence-associated secretory phenotype, SASP), в них повреждаются молекулы и органеллы, нарушается метаболизм [27]. SIPS — это вариант клеточного старения (в этом случае также в значении cell senescence; рисунок), который характеризуется стабильной остановкой пролиферации, инициируемой различными молекулярными триггерами [27–30]. Этот подход позволяет сэкономить время, так как «старение» действительно происходит преждевременно, в отличие от классического варианта модели Хейфлика, при котором клетки состариваются в течение многих месяцев. Кроме того, модель SIPS применима не только для нормальных, но и для раковых клеток (в отличие от модели репликативного старения). В то же время, у нее есть ряд существенных минусов. Во-первых, индуцирующие старение воздействия являются совершенно не физиологичными. Примером фактора, вызывающего SIPS, можно считать химиотерапию, индуцирующую повреждения в клетках опухолей. Во-вторых, модель основана на концепции, согласно которой повреждения ограничивают пролиферацию клеток, после чего она прекращается. Однако нельзя сказать, что установленная последовательность событий обязательно верна. В частности, обычно *in vivo* наблюдается обратная ситуация — клетки организма перестают делиться по естественным причинам (например, вследствие терминальной дифференцировки), а уже из-за этого клеточная популяция накапливает ошибки и повреждения, которые ведут, в конечном счете, к ее старению и гибели. Так происходит, например, с постмитотическими высокодифференцированными клетками организма — нейронами и кардиомиоцитами [31, 32]. Если же клеточная популяция может обновляться за счет размножения составляющих ее клеток, то ошибки и повреждения в ней не накапливаются, т.к. разбавляются при появлении новых клеток. Клетки с повреждениями удаляются из популяции, при этом сама популяция остается «молодой». Примерами подобных популяций могут быть не только пересеваемые линии трансформированных клеток, но и организмы вроде пресноводной гидры [33, 34]. Если же организм или ткань состоят из клеток, которые не могут делиться, так как выполняют определенные функции, и являются терминально дифференцированными, то через определенное время неизбежно происходит гибель такого организма или ткани. Примером могут служить нематоды, постмитотические ткани и специализированные клетки крови млекопитающих, большая часть тканей имаго насекомых с метаморфозом.

По мнению сторонников модели SIPS, «сенильные» клетки выделяют регуляторы воспаления, которые влияют на поведение соседних клеток и способствуют старению тканей и органов

организма [35]. С моделью SIPS связано понятие «ответ на повреждения ДНК» (DNA damage response, DDR). Считается, что индукции SIPS способствуют повреждения ДНК, которые возникают под воздействием различных внешних факторов и становятся причиной остановки пролиферации. Надо отметить, что в этом случае мы сталкиваемся с той же проблемой, с которой исследователи встречаются при выборе контрольных животных [36]. Если и контрольная, и экспериментальная группы подвержены влиянию, например, перекиси водорода или доксирубицина, то интактного контроля нет. Таким образом, соединение, которое смягчит негативное воздействие перекиси, улучшит также и состояние экспериментальных клеточных культур, но это не сделает его геропротектором.

Другая модельная система — «стационарное», или хронологическое, старение культур клеток (рисунок) — основана на идее ограничения пролиферации как основного пускового механизма старения [37–40]. В рамках хронологического/«стационарного» старения ограничение пролиферации возникает, когда культура клеток или суспензия микроорганизмов переходят в стационарную фазу роста, т.е. перестают размножаться (quiescence). После пребывания в течение некоторого времени в стационарной фазе роста клетки начинают гибнуть из-за накопления нарушений в физиологической работе внутриклеточных систем и повреждений органелл и макромолекул. Способствует развитию «старения» ограничение пролиферации, которое не нужно вызывать путем воздействия повреждающих химических или физических факторов. Модельная система является универсальной и может быть применима к клеткам самого разного происхождения, включая простейших, бактерии, грибы, водоросли и т.п. [40].

Сторонники модели хронологического/«стационарного» старения считают, что старение клеток (уже в значении cell aging) — это накопление повреждений и негативных изменений, сходных с повреждениями и изменениями, накапливающимися в клетках стареющего организма и приводящими к увеличению вероятности их смерти со временем. Чтобы примирить две разные концепции старения клеток, исследователи часто говорят о том, что с помощью репликативного старения и SIPS можно моделировать возрастные изменения делящихся, а с помощью хронологического — постмитотических клеток организма [39]. Однако все далеко не так просто: в частности, есть основания полагать, что постмитотические клетки также приобретают старческий секреторный фенотип [41, 42]. Основанием для такого предположения могут служить результаты исследований с использованием сенолитиков (веществ, избирательно убивающих «сенесцентные» клетки) на животных — так называемой сенотерапией. Приме-

нение сенотерапии у мышей способствует улучшению выносливости мышц, которые, как известно, состоят преимущественно из терминально дифференцированных миоцитов [43, 44]. На самом же деле из-за разных представлений о старении и о смысле понятий «senescence» и «aging» часто возникает путаница. Например, исследователи, работающие с SIPS, считают, как правило, что аутофагия оказывает негативное влияние на клетку, так как она может способствовать ее старению в значении senescence [45]. В то же время сторонники хронологического старения полагают, что аутофагия спасает клетки, помогает им выживать и обновлять внутриклеточный материал [46, 47]. Интерпретация роли аутофагии в рамках модели SIPS требует уточнения. Сенесцентное («senescent») состояние можно считать терминальной стадией, в то время как старение в значении «aging» — это более растянутый во времени процесс. Когда клетки достигают сенесцентного состояния, аутофагия может только спровоцировать гибель клетки.

Наибольшее распространение модель хронологического/«стационарного» старения получила в экспериментах на дрожжах (рисунок), для которых на сегодняшний день получено значительное количество экспериментальных данных, позволивших лучше понять механизмы старения на клеточном уровне [39, 48]. В частности, эксперименты с дрожжами *S. cerevisiae* показали, что рапамицин, хорошо известный ингибитор TOR (target of rapamycin), в малых дозах, достаточных для замедления пролиферации дрожжевых клеток, но не полностью блокирующих этот процесс, увеличивает продолжительность жизни культуры в модели хронологического старения [47, 49]. Позже было показано, что это соединение также увеличивает продолжительность жизни экспериментальных животных — мышей [50] и плодовых мушек [51].

Как и любая модель, модель хронологического старения имеет свои недостатки. Безусловно, клетки в культуре далеки в физиологическом плане от постмитотических клеток в организме — они не имеют специализации и не выполняют функций, а причиной остановки их пролиферации, как правило, являются контактное торможение и метаболические перестройки, а не терминальная дифференцировка (впрочем, модели старения, в которых индуцируется дифференцировка клеток, тоже существуют [52]). Тем не менее, результаты многочисленных исследований позволяют обнаружить сходство между возрастными нарушениями в клетках организма и в клетках, претерпевших хронологическое/«стационарное» старение [47, 49, 53].

О проблемах с использованием нормальных клеток, обладающих ограниченным пролиферативным потенциалом, в экспериментах в рамках модели «стационарного» старения, мы уже неод-

нократно писали ранее [36, 54], подчеркивая, что оптимально, по всей видимости, выбирать для таких исследований иммортализованные клетки человека.

Критерии клеточного старения

С помощью клеточных моделей можно относительно быстро тестировать потенциальные геропротекторы (соединения, замедляющие старение). Однако необходимо установить критерии, по которым можно оценить, замедляет или ускоряет изучаемое биологически активное соединение или физический фактор старение культуры клеток. При изучении репликативного старения и SIPS, как правило, исследователи пользуются биомаркерами «возраста» *in vitro*, поэтому геропротекторные свойства они оценивают по появлению/накоплению этих маркеров [55]. Важно отметить, что рекомендуется использовать не один маркер, а несколько разных в совокупности [27, 56].

Наиболее надежным способом обнаружения у изучаемого соединения геропротекторных свойств в экспериментах с животными является построение кривых выживания [57]. По изменению формы этих кривых можно сделать выводы о том, как влияет соединение на характер старения популяции. Подобный подход можно использовать и в экспериментах на клеточных культурах [58, 59]. И, конечно же, применяют его преимущественно в рамках модели хронологического/«стационарного» старения.

Полученные в ходе экспериментов с клеточными культурами результаты всегда необходимо сопоставлять с результатами экспериментов, проведенных на животных. Факторы, благоприятно влияющие на отдельные клетки, не обязательно будут полезным для целого организма, и в то же время соединения, вызывающие гибель клеток в культуре, могут оказать положительное влияние на организм. Многое зависит от природы используемых клеток, также немаловажен и тот факт, что исследуемые *in vitro* клетки не подвержены воздействию регуляторных систем организма – нервной, эндокринной и иммунной. Кроме того, как уже упоминалось, клетки в культуре почти не выполняют никаких функций, в то время как в организме каждая клетка «служит» определенным целям, что сказывается на ее состоянии. В связи с этим интерпретация результатов цитогеронтологических экспериментов, как и любых экспериментов на клеточных культурах, требует от исследователя осторожности и, что принципиально, четкого определения понятия «старение».

Согласно классическому определению, старение – это сложный комплекс негативных возрастных изменений в организме, которые ведут к увеличению вероятности его смерти со временем (увеличению силы смертности) [57]. Что касается хронологического/«стационарного» старения, то

обычное для таких экспериментов снятие кривых выживания культур клеток подразумевает, что старение происходит в соответствии с данным определением. Наличие же этой зависимости в рамках модели репликативного старения или SIPS не так очевидно, потому что в работах, посвященных этим моделям, не снимаются кривые выживания. Впрочем, с прохождением пассажей клетки приближают момент своей гибели, а вероятность гибели увеличивается со временем и для клеток, поврежденных воздействию того или иного фактора. Косвенно об этом можно судить по тому, что с каждым пассажем способность клеток давать колонии уменьшается [60].

Биомаркеры старения

Список самых популярных биомаркеров старения включает активность ассоциированной со старением β -галактозидазы (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal), экспрессию белков p53 и p21, а также регуляторов воспаления, таких как IL-6 или IL-8, активацию белков, стимулирующих репарацию ДНК, и т.д. [26]. Их используют в работах с репликативной моделью старения и моделью SIPS.

Возможность использования активности SA- β -gal в качестве биомаркера старения была впервые описана Димри с соавт. в 1995 г. [61], показавшими, что экспрессия этого фермента увеличивается с возрастом как *in vitro*, так и *in vivo*. Несмотря на популярность этого биомаркера старения на рубеже 2000-х гг., надо заметить, что проявление активности SA- β -gal, как неоднократно было показано, во многих случаях зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследования и/или наличия определенных патологий, а также, что наиболее важно, от пролиферативного статуса клеток [62]. Вероятно, ограничение клеточной пролиферации по любой причине (дифференцировка, контактное торможение, повреждающие ДНК соединения, некоторые заболевания и т.д.) становится фактором, вызывающим стимуляцию экспрессии SA- β -gal. Таким образом, SA- β -gal появляется не только в «сенесцентных» клетках, но и в «молодых» клетках организма при развитии патологий, а также при хронологическом старении.

Другим популярным биомаркером старения, введенным в экспериментальную практику значительно раньше SA- β -gal, является липофусцин. Исследования *in vitro* и *in vivo* с выявлением внутриклеточных гранул, нерастворимых в растворителях жиров, но окрашивающихся, тем не менее, реактивами на липиды в оранжевый и коричневый цвета, активно проводились в середине XX в. Обнаруживали подобные гранулы в клетках самых разных органов, но их выявление в нейронах почти сразу связали с проявлением старческих изменений в центральной нервной системе [63].

В результате исследования с использованием липофусцина стали популярными среди геронтологов. Этот показатель популярен и сейчас — по публикациям можно видеть, что экспериментаторы снова вернулись к использованию этого маркера в цитогеронтологических экспериментах [64, 65], так как обнаружили некоторые преимущества метода определения липофусцина перед методом оценки активности SA- β -gal.

Липофусцином исходно называли продукты окисления ненасыщенных жирных кислот, образующиеся при нарушении их метаболизма. Однако в состав липофусцина входят не только липиды (хотя на 70–80% гранулы состоят из них), но также белки и металлы. В составе пигментных гранул обнаруживают и ферменты — например, кислую фосфатазу, что свидетельствует, наряду со сходным внешним видом, об их родстве с лизосомами. По сути, эти гранулы начинают формироваться именно в лизосомах, которые не могут их разрушить, в конечном итоге липофусцин полностью лишает органеллы возможности нормально функционировать. В экспериментах *in vitro* можно добиться образования липофусцина — например, с помощью методов, применяемых в модели SIPS [64, 66]. Что касается организма, то наибольший интерес представляет накопление этого «пигмента изнашивания» в постмитотических клетках — нейронах и кардиомиоцитах, так как оно действительно коррелирует с возрастом. Активно функционирующий нейрон за десятилетия работы заполняется пигментами такого типа, что свидетельствует о постепенном нарушении метаболизма.

Хотелось бы отметить, что накопление липофусцина и проявление активности SA- β -gal имеют общую причину, так как оба эти маркера отражают проблемы, связанные с работой лизосом. До сих пор не установлено, что является первичным — повреждение ДНК в ядре или нарушение протеолиза в цитоплазме [67], поэтому исследования с использованием этих биомаркеров действительно могут помочь в понимании фундаментальных процессов старения. Биомаркеры «сенесцентного» состояния и хронологического старения будут, вероятно, во многих случаях совпадать (различаться будет только их выраженность). Например, биомаркеры «сенесцентного» состояния появляются в постмитотических клетках [41, 42]. Старение культуры, по-видимому, начинается тогда, когда составляющие ее клетки перестают делиться и обновляться, однако «сенесцентный» фенотип они приобретают только на поздних стадиях старения.

Еще одним биомаркером старения можно считать увеличение объема цитоплазмы [68]. Как известно, существует связь между остановкой пролиферации и увеличением объема клетки [69]. Согласно одному из предположений, это может происходить из-за постоянной замены старой

культуральной среды на новую, содержащую большое количество ростовых факторов из сыворотки, способствующих гипертрофии клеток [70]. Однако нам кажется, что такое увеличение объема цитоплазмы может происходить из-за потребности клетки в разбавлении испорченных органелл и дефектных молекул с помощью производства новых органелл и молекул. Если в клетке, как упоминалось выше, нарушены системы протеолиза, то избавляться от неправильно работающих органелл и макромолекул ей сложно, поэтому доступным выходом становится образование новых компонентов клетки. Такое разбавление может быть только временной мерой, кардинальным образом исправить ситуацию оно не помогает.

С увеличением объема цитоплазмы связаны и метаболические перестройки. Возможно, «сенесцентные» клетки, переставшие пролиферировать, используют гликолиз и глутаминолиз для наращивания объема цитоплазмы [70] через активацию комплекса mTOR. «Сенесцентные» клетки действительно характеризуются активацией mTOR, которая не исчезает даже при сывороточном или аминокислотном голодании [71]. Это, кстати, снова роднит два разных подхода к изучению клеточного старения, ведь активация mTOR характерна для хронологического старения.

Наконец, важной темой в клеточной геронтологии являются перспективы сенотерапии с использованием сенолитиков. Благодаря развитию этого направления заметно увеличилось число исследований и публикаций, связанных с изучением SIPS. С помощью очистки организма от «сенесцентных» клеток удается продлить среднюю, медианную и максимальную продолжительность жизни у мышей, а также улучшить некоторые из их возрастных показателей [72–74]. Так как принцип определения препарата как сенолитика базируется на проявлении биомаркеров старения, ориентируясь на которые, можно осуществлять поиск способов для избирательной индукции гибели клеток, необходимо иметь в виду, что эти маркеры могут свидетельствовать не только о «сенесцентном» состоянии, но и о старении клеток. Процесс старения постепенно захватывает все большее число клеток в популяции, но только на поздних стадиях развивается SASP. Требуется большое число исследований, которые помогли бы установить, как и когда необходимо запускать процесс гибели клеток. Необходимо понять, что лучше — действовать сенолитиками на клетки, которые уже приобрели SASP, или на клетки, которые только начали стареть.

Заключение

История вопроса о том, стареют ли отдельные клетки, начинается с экспериментов Алексиса Карреля, продолжается в исследованиях Леонарда Хейфлика и далека от завершения на сегодняшний день. Несмотря на большой интерес к этой

области, до сих пор существует много разногласий по поводу того, что является «старением клеток». Созданные модели не являются идеальными, но они помогли многое понять. Наиболее перспективными в ближайшее время будут исследования *in vivo*, их требуется как можно больше для понимания процессов, происходящих в клеточных популяциях и отдельных клетках организма [70, 75]. Дегенерация клеток в организме может происходить как из-за внутренних нарушений, так и из-за

негативного воздействия микроокружения. Впрочем, клеточные модели все еще могут быть полезными для проверки некоторых гипотез.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № 121032300215-6) без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khokhlov A.N.* From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // *Biophysics*. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
2. *Medvedev Z.A.* On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanisms. A review // *Mech. Ageing Dev.* 1981. Vol. 17. N 4. P. 331–359.
3. *Kirkwood T.B., Cremer T.* Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress // *Hum. Genet.* 1982. Vol. 60. N 2. P. 101–121.
4. *Weismann A.* Das Keimplasma. Eine theorie der vererbung. Jena: G. Fischer, 1892. 628 pp.
5. *Carrel A.* Artificial activation of the growth *in vitro* of connective tissue // *J. Exp. Med.* 1912. Vol. 17. N 1. P. 14–19.
6. *Carrel A.* Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue // *J. Exp. Med.* 1913. Vol. 18. N 3. P. 287–298.
7. *Swim H.E., Parker R.F.* Culture characteristics of human fibroblasts propagated serially // *Am. J. Hyg.* 1957. Vol. 66. N 2. P. 235–234.
8. *Hayflick L., Moorhead P.S.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1961. Vol. 25. N 3. P. 585–621.
9. *Hayflick L.* The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* 1965. Vol. 37. N 3. P. 614–636.
10. *Hayflick L.* Aging under glass // *Mutat. Res., DNAging: Genet. Instab. Aging*, 1991. Vol. 256. N 2–6. P. 69–80.
11. *Hayflick L.* Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3. N 12: e220.
12. *Hayflick L.* How and why we age. N.Y.: Ballantine Books, 1996. 377 pp.
13. *Olovnikov A.M.* Hypothesis: lifespan is regulated by chromomere DNA of the hypothalamus // *J. Alzheimer's Dis.* 2007. Vol. 11. N 2. P. 241–252.
14. *Macieira-Coelho A.* Cell division and aging of the organism // *Biogerontology*. 2011. Vol. 12. N 6. P. 503–515.
15. *Olovnikov A.M.* A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* 1973. Vol. 41. N 1. P. 181–190.
16. *Greider C.W., Blackburn E.H.* Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts // *Cell*. 1985. Vol. 43. N 2. P. 405–413.
17. *Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C.* Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. Vol. 95. N 18. P. 10614–10619.
18. *Mikhelson V.M.* Replicative mosaicism might explain the seeming contradictions in the telomere theory of aging // *Mech. Ageing. Dev.* 2001. Vol. 122. N 13. P. 1361–1365.
19. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
20. *Laun P., Bruschi C.V., Dickinson J.R., Rinnerthaler M., Heeren G., Schwimbersky R., Rid R., Breitenbach M.* Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing // *Nucleic Acids Res.* 2007. Vol. 35. N 22. P. 7514–7526.
21. *Roux A.E., Quissac A., Chartrand P., Ferbeyre G., Rokeach L.A.* Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2 // *Aging Cell*. 2006. Vol. 5. N 4. P. 345–357.
22. *von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C.* Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? // *Exp. Cell Res.* 1995. Vol. 220. N 1. P. 186–193.
23. *Toussaint O., Dumont P., Dierick J.F., Pascal T., Fripiat C., Chainiaux F., Sluse F., Eliaers F., Remacle J.* Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000. Vol. 908. P. 85–98.
24. *Sikora E., Arendt T., Bennett M., Narita M.* Impact of cellular senescence signature on ageing research // *Ageing Res. Rev.* 2011. Vol. 10. N 1. P. 146–152.
25. *Campisi J.* Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2011. Vol. 21. N 1. P. 107–112.
26. *de Jesus B.B., Blasco M.A.* Assessing cell and organ senescence biomarkers // *Circ. Res.* 2012. Vol. 111. N 1. P. 97–109.
27. *Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A., et al.* Cellular senescence: defining a path forward // *Cell*. 2019. Vol. 179. N 4. P. 813–827.
28. *Jeyapalan J.C., Sedivy J.M.* Cellular senescence and organismal aging // *Mech. Ageing Dev.* 2008. Vol. 129. N 7–8. P. 467–474.
29. *Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S.* The essence of senescence // *Genes Dev.* 2010. Vol. 24. N 22. P. 2463–2479.
30. *Giaimo S., D'Adda di Fagagna F.* Is cellular senescence an example of antagonistic pleiotropy? // *Aging Cell*. 2012. Vol. 11. N 3. P. 378–383.
31. *Cuervo A.M., Bergamini E., Brunk U.T., Dröge W., Ffrench M., Terman A.* Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells // *Autophagy*. 2005. Vol. 1. N 3. P. 131–140.
32. *Morgunova G.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N.* Effect of caloric restriction on aging: Fixing the problems of

- nutrient sensing in postmitotic cells? // *Biochemistry (Mosc.)*. 2021. Vol. 86. N 10. P. 1352–1367.
33. Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // *Int. J. Dev. Biol.* 2012. Vol. 56. N 6–8. P. 479–487.
34. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
35. Lopes-Paciencia S., Saint-Germain E., Rowell M.C., Ruiz A.F., Kalegari P., Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation // *Cytokine*. 2019. Vol. 117. P. 15–22.
36. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.
37. Nyström T. Aging in bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. Vol. 5. N 6. P. 596–601.
38. Leontieva O.V., Blagosklonny M.V. Yeast-like chronological senescence in mammalian cells: phenomenon, mechanism and pharmacological suppression // *Aging (Albany N.Y.)*. 2011. Vol. 3. N 11. P. 1078–1091.
39. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // *Cell Metab.* 2012. Vol. 16. N 1. P. 18–31.
40. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
41. Anderson R., Lagnado A., Maggiorani D., et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence // *The EMBO J.* 2019. Vol. 38. N 5: e100492.
42. von Zglinicki T., Wan T., Miwa S. Senescence in post-mitotic cells: a driver of aging? // *Antioxid. Redox Signal.* 2021. Vol. 34. N 4. P. 308–323.
43. Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., LeBrasseur N.K., Childs B.G., Van De Sluis B., Kirkland J.L., Van Deursen J.M. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders // *Nature*. 2011. Vol. 479. N 7372. P. 232–236.
44. Zhu Y.I., Tchkonja T., Pirtskhalava T., et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs // *Aging Cell*. 2015. Vol. 14. N 4. P. 644–658.
45. Young A.R., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J.F., Tavaré S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F.M., Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition // *Genes Dev.* 2009. Vol. 23. N 7. P. 798–803.
46. Kaerberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K. Recent developments in yeast aging // *PLOS Genet.* 2007. Vol. 3. N 5: e84.
47. Alvers A.L., Wood M.S., Hu D., Kaywell A.C., Dunn W.A. Jr., Aris J.P. Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin // *Autophagy*. 2009. Vol. 5. N 6. P. 847–849.
48. Werner-Washburne M., Braun E., Johnston G.C., Singer R.A. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1993. Vol. 57. N 2. P. 383–401.
49. Powers R.W., Kaerberlein M., Caldwell S.D., Kennedy B.K., Fields S. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. N 2. P. 174–184.
50. Miller R.A., Harrison D.E., Astle C.M., Fernandez E., Flurkey K., Han M., Javors M.A., Li X., Nadon N.L., Nelson J.F., Pletcher S. Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction // *Aging Cell*. 2014. Vol. 13. N 3. P. 468–477.
51. Bjedov I., Toivonen J.M., Kerr F., Slack C., Jacobson J., Foley A., Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *Cell Metab.* 2010. Vol. 11. N 1. P. 35–46.
52. Zoico E., Rizzatti V., Policastro G., Tebon M., Darra E., Rossi A.P., Mazzali G., Fantin F., Zamboni M. In vitro model of chronological aging of adipocytes: interrelationships with hypoxia and oxidation // *Exp. Gerontol.* 2019. Vol. 121. P. 81–90.
53. Wierman M.B., Maqani N., Strickler E., Li M., Smith J.S. Caloric restriction extends yeast chronological lifespan by optimizing the Snf1 (AMPK) signaling pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2017. Vol. 37. N 13: e00562–16.
54. Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018. Vol. 73. N 4. P. 185–190.
55. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // *Adv. Gerontol.* 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
56. Wiley C.D., Flynn J.M., Morrissey C., Lebofsky R., Shuga J., Dong X., Unger M.A., Vijj J., Melov S., Campisi J. Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16. N 5. P. 1043–1050.
57. Comfort A. Ageing: The biology of senescence. London: Routledge & Kegan Paul, 1964. 365 pp.
58. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Klebanov A.A. Demographic approaches to the study of aging on cell cultures // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2019. Vol. 74. N 4. P. 262–267.
59. Yang Y., Santos A.L., Xu L., Lotton C., Taddei F., Lindner A.B. Temporal scaling of aging as an adaptive strategy of *Escherichia coli* // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5. N 5: eaaw2069.
60. Maier A.B., Maier I.L., van Heemst D., Westendorp R.G.J. Colony formation and colony size do not reflect the onset of replicative senescence in human fibroblasts // *J. Gerontol., Ser. A*. 2008. Vol. 63. N 7. P. 655–659.
61. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M.A., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995. Vol. 92. N 20. P. 9363–9367.
62. Morgunova G.V., Kolesnikov A.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Senescence-associated β -galactosidase—A biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 165–167.
63. Samorajski T., Ordj J.M., Keefe J.R. The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice // *J. Cell Biol.* 1965. Vol. 26. N 3. P. 779–795.
64. Georgakopoulou E.A., Tsimaratou K., Evangelou K., Fernandez M.P., Zoumpouris V., Trougakos I.P., Kleitas D., Bartek J., Serrano M., Gorgoulis V.G. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues // *Aging (Albany N.Y.)*. 2013. Vol. 5. N 1. P. 37–50.
65. Salmonowicz H., Passos J.F. Detecting senescence: a new method for an old pigment // *Aging Cell*. 2017. Vol. 16. N 3. P. 432–434.

66. Sitte N., Merker K., Grune T., von Zglinicki T. Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts *in vitro*: an indicator of oxidative stress // *Exp. Gerontol.* 2001. Vol. 36. N 3. P. 475–486.
67. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. The hallmarks of aging // *Cell.* 2013. Vol. 153. N 6. P. 1194–1217.
68. Neurohr G.E., Terry R.L., Lengefeld J., Bonney M., Brittingham G.P., Moretto F., Miettinen T.P., Vaites L.P., Soares L.M., Paulo J.A., Harper J.W. Excessive cell growth causes cytoplasm dilution and contributes to senescence // *Cell.* 2019. Vol. 176. N 5. P. 1083–1097.
69. Ginzberg M.B., Kafri R., Kirschner M. On being the right (cell) size // *Science.* 2015. Vol. 348. N 6236. P. 1245075.
70. Ogronnik M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo* // *Aging Cell.* 2021. Vol. 20. N 4. P. e13338.
71. Carroll B., Nelson G., Rabanal-Ruiz Y., Kucheryavenko O., Dunhill-Turner N.A., Chesterman C.C., Zahari Q., Zhang T., Conduit S.E., Mitchell C.A., Maddocks O.D. Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing // *J. Cell Biol.* 2017. Vol. 216. N 7. P. 1949–1957.
72. Baker D.J., Childs B.G., Durik M., Wijers M.E., Sieben C.J., Zhong J., Saltness R.A., Jeganathan K.B., Verzosa G.C., Pezeshki A., Khazaie K., Miller J.D., van Deursen J.M. Naturally occurring p16^{Ink4a}-positive cells shorten healthy lifespan // *Nature.* 2016. Vol. 530. N 7589. P. 184–189.
73. Yousefzadeh M.J., Zhu Y.I., McGowan S.J., et al. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan // *EBioMedicine.* 2018. Vol. 36. P. 18–28.
74. Xu Q., Fu Q., Li Z., Liu H., Wang Y., Lin X., He R., Zhang X., Ju Z., Campisi J., Kirkland J.L. The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice // *Nat. Metab.* 2021. Vol. 3. N 12. P. 1706–1726.
75. Tang H., Geng A., Zhang T., Wang C., Jiang Y., Mao Z. Single senescent cell sequencing reveals heterogeneity in senescent cells induced by telomere erosion // *Protein Cell.* 2019. Vol. 10. N 5. P. 370–375.

Поступила в редакцию 19.05.2022

После доработки 27.06.2022

Принята в печать 04.07.2022

REVIEW

Signs of similarities and differences in cellular models of aging. A scoping review

G.V. Morgunova ^{*} , A.N. Khokhlov 

*Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia*

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

Despite the great interest of scientists in the question of what cell aging is, and the long history of its study, there are still many contradictions in this area. They arise because several different approaches have been developed to model aging *in vitro*. As a result, even different terms arose – *cell senescence* and *cell aging*. There are not only differences between models for studying aging at the cellular level, they also have common features. Moreover, it is now becoming apparent that some models complement others. This is evidenced, in particular, by the fact that biomarkers used in one model are suitable for use in another (aging-associated β -galactosidase, lipofuscin, etc.). The development of approaches to the study of cellular aging has been uneven, and at present, research on this topic is experiencing another rise due to the prospects for the use of senolytics (drugs that selectively eliminate “senescent” cells) to increase the lifespan of multicellular organisms. This review considers the pros and cons of various models for studying aging on cultured cells of various nature.

Keywords: *aging, cell cultures, biomarkers of aging, cytoogerontology, replicative senescence, chronological aging*

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

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5259-0861>

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.263+636.087.8

Морфологический и молекулярно-генетический анализ штаммов зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы»

Е.С. Кривина* , А.Д. Темралеева 

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Россия, 142290, г. Пушкино, Проспект науки, д. 3

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

В настоящей работе с помощью морфологического и молекулярно-генетического анализов впервые были изучены *Chlorella*-подобные штаммы зеленых микроводорослей из различных отечественных коммерческих биопрепаратов. Установлено, что во всех анализируемых образцах присутствуют представители *Chlorella*-клады или сестринской *Parachlorella*-клады. Кроме того, были обнаружены микроводоросли из родов *Edaphochlorella*, *Chloroidium*, *Edaphochloris* и *Muriella*, принадлежащих классу Trebouxiophyceae, а также *Coelastrella* и *Chromochloris*, относящиеся к классу Chlorophyceae. По данным прямой световой микроскопии во всех препаратах наблюдали нитчатые цианобактерии, а в биопрепарате «Гера» было отмечено наличие диатомовых водорослей. Поскольку правильная идентификация зеленых микроводорослей на основе фенотипических признаков весьма затруднительна вследствие их скудности, неинформативности и изменчивости, контроль за составом микроводорослей в биопрепаратах следует осуществлять, используя современные молекулярно-генетические методы.

Ключевые слова: биопрепараты, *Chlorella*-подобные водоросли, морфология, филогения, идентификация, видовое богатство, криптические виды

Род *Chlorella* sensu lato является архетипом одноклеточных зеленых микроводорослей (Chlorophyta) и высокопроизводительным первичным продуцентом водных и наземных экосистем. Впервые он был описан М.В. Бейеринком в 1890 г. и изначально объединял все мелкие (<10 мкм) коккоидные одноклеточные зеленые микроводоросли из водных местообитаний. Несмотря на длительную историю изучения, до сих пор в систематике *Chlorella*-подобных микроводорослей существует много пробелов, связанных с высоким криптическим разнообразием группы, вследствие чего в ряде случаев практически невозможно правильно определить с помощью световой микроскопии фенотипически слабо дифференцированные таксоны. Многие морфологические признаки (например, формирование колоний, продуцирование щетинок, образование слизи) чрезвычайно вариабельны и зависят от характера и силы воздействия внешних факторов [1–4]. Тем не менее, «маленькие зеленые шарики» детально изучаются, поскольку они повсеместно распространены и играют важную экологическую роль, активно участвуя в фотосинтетической аэрации, процессах синтеза органического вещества и самоочищения сред путем аккумуляции, трансформации и минерализации

поллютантов. В настоящее время биотехнологический потенциал *Chlorella*-подобных водорослей вызывает большой интерес для биоремедиации сточных вод, производства биотоплива, кормов для животных, биологически активных добавок (БАД), медицинских и косметологических препаратов, а также в качестве удобрений в растениеводстве [5–9]. Так, например, согласно имеющимся данным, применение *Chlorella vulgaris* в рационе позволяет увеличить молочную продуктивность дойного стада, получить дополнительные привесы молодняка и взрослых особей, снизить негативное воздействие тяжелых металлов на организм животных [10–11]. В растениеводстве считается, что использование биомассы этой водоросли в качестве удобрения повышает полноту усвоения биодоступного фосфора, снижает его непродуктивную потерю и, как следствие, уменьшает риск эвтрофикации. Кроме того, замачивание семян в культуральной жидкости *Chlorella* оказывает благоприятное воздействие на степень их всхожести и длину проростков [12, 13]. Эффективность использования *Chlorella* в качестве БАД производители связывают с богатым витаминным профилем, высоким содержанием белка, полиненасыщенных жирных кислот и пигментов [12, 14]. В настоящее время

существует огромное количество биопрепаратов как на основе только *C. vulgaris*, так и в сочетании с другими водорослями. В связи с этим точная таксономическая идентификация состава таких препаратов весьма актуальна, поскольку биотехнологически значимые характеристики у представителей различных видов, несмотря на сходную морфологию, могут существенно варьировать [5, 7, 9–14].

Целью настоящей работы стало проведение таксономической идентификации штаммов *Chlorella*-подобных микроводорослей, выделенных из отечественных коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы», с помощью морфологического и молекулярно-генетического анализов.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами данного исследования стали 19 штаммов зеленых микроводорослей, выделенных из 6 отечественных биопрепаратов на основе микроводорослей рода *Chlorella* (согласно информации производителей): 1) штаммы ZS1, ZS3, ZS4 и ZS9, выделенные из напитка «Зеленое солнце» (Общество с ограниченной ответственностью (ООО) «Зеленое Солнце», Пермский край); 2) штаммы G1, G4, G5, G6 и G7 из удобрения «Гера» (ООО «Гера», Московская область); 3) штаммы Ab4 и Ab5 из удобрения «Биоабсолют» (ООО НПО «БиоТехнология», Московская область); 4) штаммы ChloN2, ChloN3 и ChloN4 из органического напитка «Живая хлорелла» (ООО «Дело», Пензенская область); 5) штаммы S2, S3 и S8 из удобрения «Живая хлорелла» (ООО «Дело», Пензенская область); 6) штаммы St1 и St6 из удобрения «StimGarden» (ООО «Дело», Пензенская область).

Изолирование и культивирование штаммов. Содержимое жидких биопрепаратов тщательно перемешивали до однородного состояния в стерильных условиях. Сухой порошок удобрения «Биоабсолют» разводили в стерильной воде Milli-Q в соотношении 1:4 в трехкратной повторности. Каплю жидкости наносили на твердую среду BG-11 с азотом (1%-ный агар, pH = 7,2) и далее многократно пересекали отдельные колонии до получения альгологически чистых культур. Изоляты культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура +23–25°C, свет 60–75 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, фотопериод 12 ч).

Морфологический и молекулярно-генетический анализ осуществляли по стандартным методикам, подробно описанным в статье Кривиной с соавт. [15].

Результаты и обсуждение

Состав каждого из исследуемых биопрепаратов был предварительно изучен с помощью прямой световой микроскопии. В результате было установлено, что ни один из них не является аль-

гологически чистой культурой *C. vulgaris*, как заявлено на этикетках. Во всех коммерческих продуктах наблюдали разные по морфологии зеленые водоросли и цианобактерии, а также гифы и цисты микроскопических грибов. Наибольшим разнообразием отличался биопрепарат «Гера», в составе которого дополнительно обнаружены диатомеи. В результате изоляции и очистки штаммов из биопрепаратов было получено 56 культур микроводорослей и 8 культур цианобактерий. Для дальнейшего анализа было отобрано 19 наиболее часто встречающихся штаммов зеленых микроводорослей с *Chlorella*-подобной морфологией хотя бы на одном из этапов жизненного цикла (табл. 1).

Согласно результатам филогенетического анализа с использованием фрагмента нуклеотидной последовательности 18S–ITS1–5.8S–ITS2 только девять штаммов вошли в состав *Chlorella*-клады (рис. Прилож. 1). Так, штаммы S3, ZS1, ChloN4, Ab5 с максимальной статистической поддержкой кластеризовались с представителями голотипа рода *Chlorella* – *C. vulgaris*. Генетические различия внутри кластера, объединяющего штаммы *C. vulgaris*, не превышали 0,1% (внутривидовой уровень в рамках *Chlorella*-клады). Строение и вторичная структура внутренних транскрибируемых спейсеров штаммов S3, ZS1, ChloN4, Ab5 были идентичны аутентичному штамму SAG 211-11b.

Штаммы ZS9 и G1 с максимальной статистической поддержкой группировались с аутентичным штаммом *C. sorokiniana* SAG 211-8k. Морфологические характеристики (табл. 1) и уровень генетических различий (менее 0,1%) также подтвердили принадлежность к этому виду. При этом отметим, что, несмотря на сходную морфологию с типовым видом *C. vulgaris*, молекулярно-генетический анализ показал, что «истинными» хлореллами данная группа организмов не является [2, 15]. Внутренние транскрибируемые спейсеры исследуемых штаммов были идентичны аутентичному штамму *C. sorokiniana*.

Штамм ChloN3 с максимальной статистической поддержкой вошел в состав кластера, объединяющий представителей *Parachlorella kessleri* (прил. 1). Генетические дистанции внутри кластера были менее 0,1% и соответствовали внутривидовому уровню, в то время как межвидовые генетические дистанции варьировали в диапазоне от 0,4 до 0,9%. Хотя последовательности спейсеров ITS1 и ITS2 между штаммом ChloN3 и аутентичным штаммом SAG 211-11g не были идентичны, компенсаторные замены (compensatory base change – CBC) в них отсутствовали.

Исследуемые штаммы ChloN2 и St1 вошли в кластер с *Planktochlorella nurekis*. Принадлежность к этому виду подтверждена также результатами морфологического анализа (табл. 1) и анализа генетических дистанций. Различия с аутентичным штаммом CAUP H 8701 составляли

менее 0,1% (внутривидовой уровень). СВС во вторичной структуре ITS1 и ITS2 между исследуемыми штаммами и CAUP H 8701 не обнаружены.

Штамм St6 морфологически был близок к представителям рода *Chloroidium* (табл. 1, рис. Прилож. 1), что было подтверждено с помощью филогенетического анализа: исследуемый штамм кластеризовался с представителями *C. saccharophilum*, включая аутентичный штамм SAG 2149. Генетические различия фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 между штаммами St6 и SAG 2149 составляли 0,3%. В рамках рода *Chloroidium* такой уровень различий соответствует внутривидовому, в то время как межвидовые генетические дистанции составляют не менее 0,9%. Кроме того, в составе нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК штамма St6 так же, как и у других представителей *C. saccharophilum*, присутствует интрон длиной 399 нуклеотидов. Вторичная структура внутренних транскрибируемых спейсеров штамма St6 не имела существенных отличий от аутентичного штамма SAG 2149. СВС в ITS1 и ITS2 отсутствовали.

Морфологические характеристики штаммов G4, ZS3 и S2 соответствовали зеленой водоросли *Edaphochlorella mirabilis* (табл. 1). Уровень генетических различий фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 (рис. Прилож. 1) между исследуемыми штаммами был не более 0,1%, с аутентичным штаммом *E. mirabilis* SAG 38.88 и близким к нему штаммами – 0,4–0,5%. Однако на данном этапе исследования, ввиду того, что род *Edaphochlorella* монотипный, нельзя с уверенностью рассматривать этот уровень генетических различий как внутривидовой или межвидовой. Тем не менее, на основании полного

сходства последовательностей ITS1 и ITS2 между штаммами ZS3, G4, S2 и SAG 38.88, а также отсутствия СВС во вторичной структуре спейсеров все три штамма были идентифицированы как *E. mirabilis*.

Штаммы G6 и ZS4 морфологически были близки к *Nannochloris*-подобным водорослям (табл. 1). В настоящее время идентификация и классификация видов и родов *Nannochloris*-клады основаны на анализе гена 18S рРНК, поскольку информации о нуклеотидных последовательностях спейсеров крайне мало [24–26]. Согласно результатам филогенетического анализа гена 18S рРНК, штаммы ZS4 и G6 с максимальной статистической поддержкой вошли в состав кластера *Edaphochloris andrejevii* (рис. Прилож. 2), типового вида недавно описанного нового рода микроводорослей [24]. Уровень генетических различий с сестринскими штаммами не превышал 0,1%, что в данной кладе соответствует внутривидовому уровню. Различия нуклеотидных последовательностей ITS2 с учетом вторичной структуры между исследуемыми штаммами и аутентичным штаммом ACSSI 104 не были обнаружены.

В соответствии с морфологическими характеристиками штамм G7 был предварительно определен как *Muriella terrestris* (табл. 1), что впоследствии подтвердилось данными 18S рРНК-анализа (рис. Прилож. 2). Генетические дистанции не превышали 0,1%. Дополнительно был проанализирована нуклеотидная последовательность ITS2, вторичная структура которой у штамма G7 имела тот же специфический признак, характерный для представителей *M. terrestris*, но не свойственный большинству зеленых водорослей [27], – развет-

Таблица 1

Морфологические характеристики исследуемых штаммов, выделенных из биопрепаратов

Штаммы	Форма клеток	Размер, мкм	Хлоропласт	Пиреноид	Автоспоры	Расхождение с типовым диагнозом	
<i>Chlorella vulgaris</i> S3, ZS1, ChloN4, Ab5	Ш, ШОВ	3,2 –6,5	Ч	1, с сегменти- рованной крахмальной оберткой	2–8	отсутствует [1, 3, 16–24]	
<i>C. sorokiniana</i> ZS9, G1	Ш	2,6–5,5	Ч, П		2–16		
<i>Parachlorella kessleri</i> ChloN3	О (МК), Ш (ЗК)	4,9–7,2	Ч, Ш				
<i>Planktochlorella nurekis</i> St1, ChloN2	Ш	4–11	Ч, Б				
<i>Chloroidium saccharophilum</i> St6	Ш, ШОВ	4,4 –7,8 × 2,9–6,1	Ч, П				2–4
<i>Coelastrella aeroterrestrica</i> Syp_8, BA_Chlo4	Ш, ШОВ	5 –10	Ц (МК), С (ЗК)	2–16			
<i>Edaphochlorella mirabilis</i> ZS3, G4, S2	Ш	3–8	Ч		отсутствует		
<i>Chromochloris zofingiensis</i> G5		3–20	Л (МК), Н (ЗК)				
<i>Muriella terrestris</i> G7		3–7	Ч, Б (МК), Н (ЗК)				
<i>Edaphochloris andrejevii</i> ZS4, G6		2–5,5	Ч	2–8			

Примечание: форма клеток: Ш – шаровидная, ШОВ – широкоовальная, О – овальная; МК – молодые клетки, ЗК – зрелые клетки; хлоропласт: Ч – чашевидный, П – поясковидный, Ш – шаровидный, Б – блюдцевидный, Ц – цельный, С – сегментированный, Л – лопастной, Н – несколько.

вленную шпильку III CBC между штаммами *M. terrestris* обнаружено не было.

Штаммы S8 и Ab4 изначально были идентифицированы как *Coelastrella* sp. (табл. 1). Филогенетический анализ 18S–ITS1–5.8S–ITS2 показал, что данные штаммы с максимальной статистической поддержкой входят в состав кластера *C. aeroterrestrica*, совместно с аутентичным штаммом данного вида SWK 1-2 (рис. Прилож. 3). Уровень генетических различий между штаммами S8, Ab4 и аутентичным штаммом SWK 1-2 составил менее 0,1%, а между штаммами вида *C. aeroterrestrica* данный показатель колебался от 0 до 0,4%. Для сравнения, генетические дистанции между таксономически признанными видами *C. striolata* и *C. corcontica*, а также между *C. corcontica* и *C. aeroterrestrica* составляли 0,6%. Кроме того, в составе нуклеотидной последовательности 18S рРНК у исследуемых штаммов, так же, как и у других представителей *C. aeroterrestrica*, присутствуют два интрона длиной 392 и 598 нуклеотидов. Первичная и вторичная структура ITS1 у штаммов, выделенных из биопрепаратов, была идентична таковой у аутентичного штамма SWK 1-2, включая особенность, присущую многим штаммам рода *Coelastrella* – разветвленную шпильку I. Вторичная структура ITS2 у исследуемых штаммов также характеризовалась отличительной чертой в виде разветвленной шпильки I [27] и совпадала с таковой у аутентичного штамма SWK 1-2. CBC в обоих спейсерах отсутствовали.

Штамм G5 имел морфологические признаки, типичные для зеленых микроводорослей рода *Chromochloris* (табл. 1). Однако молодые клетки обладают *Chlorella*-подобной морфологией. По данным анализа фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 исследуемый штамм со 100%-ной статистической поддержкой группировался с *Chromochloris zofingiensis* CCAAP 211/14 (рис. Прилож. 3), при этом генетические различия с аутентичным штаммом отсутствовали. Состав и вторичные структуры ITS1

и ITS2 штамма G5 и аутентичного штамма CCAAP 211/14 были идентичны, CBC отсутствовали.

Таким образом, в составе каждого из исследуемых шести отечественных коммерческих биопрепаратов были обнаружены микроводоросли либо из *Chlorella*-клады, либо из сестринской к ней *Parachlorella*-клады (табл. 2). Непосредственно *Chlorella vulgaris* была изолирована из четырех препаратов – напитков «Зеленое солнце» и «Живая хлорелла», удобрений «Биоабсолют» и «Живая хлорелла». В остальных препаратах она не была обнаружена. Из наиболее близких к ней видов в удобрении «Гера» была выявлена *C. sorokiniana*, в удобрении «StimGarden» – *Planktochlorella nurekis*. Ни один из препаратов не являлся монокультурой, как это было заявлено производителями. Среди выделенных штаммов, которые хотя бы на какой-то из стадий своего жизненного цикла обладают *Chlorella*-подобным морфотипом, были обнаружены представители родов *Edaphochlorella*, *Chloroidium*, *Coelastrella*, *Edaphochloris*, *Muriella* и *Chromochloris*. Наиболее богатым видовой состав *Chlorella*-подобных водорослей был в удобрении «Гера» и напитке «Зеленое солнце», наиболее бедным – в удобрении «Биоабсолют». В составе изученных биопрепаратов также были выявлены диатомовые водоросли и цианобактерии, что, скорее всего, является следствием контаминации исходной культуры в производственных условиях. Отметим, что правильная идентификация штаммов с *Chlorella*-подобным морфотипом весьма затруднительна вследствие скудности и неинформативности морфологических признаков, а также высокой фенотипической пластичности. Контроль качественного состава микроводорослей биопрепаратов нельзя осуществлять только при помощи световой микроскопии, необходимо привлекать современные молекулярно-генетические методы. В последнее время метабаркодирование становится все более популярным методом для изучения разнообразия микроорганизмов. Однако в данном

Таблица 2

Видовой состав зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы»

Вид	Zs	G	Ab	ChloN	S	St
<i>Chlorella vulgaris</i>	+	–	+	+	+	–
<i>C. sorokiniana</i>	+	+	–	–	–	–
<i>Parachlorella kessleri</i>	–	–	–	+	–	–
<i>Planktochlorella nurekis</i>	–	–	–	+	–	+
<i>Chloroidium saccharophilum</i>	–	–	–	–	–	+
<i>Edaphochlorella mirabilis</i>	+	+	–	–	+	–
<i>Edaphochloris andrejevii</i>	+	+	–	–	–	–
<i>Muriella terrestris</i>	–	+	–	–	–	–
<i>Coelastrella aeroterrestrica</i>	–	–	+	–	+	–
<i>Chromochloris zofingiensis</i>	–	+	–	–	–	–

Примечание: ZS – напиток «Зеленое солнце», G – удобрение «Гера», Ab – удобрение «Биоабсолют», ChloN – органический напиток «Живая хлорелла», S – удобрение «Живая хлорелла», St – удобрение «StimGarden», «+» – присутствует в биопрепарате, «–» – в биопрепарате не обнаружены

случае крайне важно правильно выбрать ДНК-баркод. При исследовании эукариотических организмов, как правило, часто используют короткие вариабельные области V4 и V9 гена 18S рРНК [28]. В процессе исследования нами было установлено, что эти регионы очень консервативны для представителей *Chlorella*-клады. Так, регион V4 гена 18S рРНК содержал 90% консервативных сайтов, V9 – 83% консервативных сайтов, что не позволяет разграничить многие виды. В связи с этим при наличии альгологически чистой культуры наиболее надежным и эффективным методом идентификации может стать амплификация в качестве ДНК-баркода ITS2 с последующим секвенированием по Сэнгеру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway [Электронный ресурс]. 2022. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения 11.04.2022).
2. Krivina E., Temraleeva A. The difficulty identifying and the cryptic diversity of *Chlorella*-clada microalgae (Chlorophyta) // Microbiology. 2020. Vol. 89. N 6. P. 714–727.
3. Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Phycologia. 2004. Vol. 43. N 5. P. 529–542.
4. Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Plant Biol. 2010. Vol. 12. N 3. P. 545–553.
5. Вайшля О.Б., Кулятов Д.В. Перспективные виды микроводорослей для биodeградации поллютантов водных экосистем юга Западной Сибири // Известия СамНЦ РАН. 2011. Т. 1. № 4. С. 787–789.
6. Mehrabadi A., Farid M.M., Craggs R. Potential of five different isolated colonial algal species for wastewater treatment and biomass energy production // Algal Res. 2017. Vol. 21. P. 1–8.
7. Adar O., Kaplan-Levy R.N., Banet G. High temperature *Chlorellaceae* (Chlorophyta) strains from the Syrian-African Rift Valley: the effect of salinity and temperature on growth, morphology and sporulation mode // Eur. J. Phycol. 2016. Vol. 51. N 4. P. 387–400.
8. Lipstein B., Hurwitz S. The nutritional value of sewage-grown samples of *Chlorella* and *Micractinium* in broiler diets // Poult. Sci. 1983. Vol. 62. N 7. P. 1254–1260.
9. Onay M., Sonmez C.A., Oktem H., Yücel M. Thermoresistant green microalgae for effective biodiesel production: Isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia // Bioresour. Technol. 2014. Vol. 169. P. 62–71.
10. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. Vol. 65. N 6. P. 635–648.
11. Shim J.Y., Shin H.S., Han H.S., Park J.G., Lim B.L., Chung K.W. Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats // J. Med. Food. 2008. Vol. 11. N 3. P. 479–485.
12. Mulbry W., Westhead E.K., Pizarro C., Sikora L. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer // Bioresour. Technol. 2005. Vol. 96. N 4. P. 451–458.
13. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review // Renew. Sust. Energ. Rev. 2014. Vol. 35. P. 265–278.
14. Беспалов В.Г., Некрасова В.Г., Иорданишвили А.К. Современный взгляд на биологически активные добавки к пище и их использование в лечебно-профилактических целях в клинической медицине // Медицина. XXI век. 2007. № 9. С. 86–94.
15. Krivina E., Temraleeva A., Sinetova M. New species *Micractinium kostikovii* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) from Russia // Phycol. Res. 2022. Vol. 70. N 1. P. 22–34.
16. Beijerinck M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen // Botanische Zeitung. 1890. Vol. 47. P. 725–785.
17. Shihira I., Krauss R.W. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. Maryland: University of Maryland, 1965. 97 pp.
18. Škaloud P., Němcová Y., Pytela J., Bogdanov N. I., Bock C., Pickinpaugh S.H. *Planktochlorella nurekis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga carrying significant biotechnological potential // Fottea. 2014. Vol. 14. N 1. P. 53–62.
19. Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., Rad Menendez C., Schumann R., Karsten U., Fried, T., Pröschold T. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Eur. J. Appl. Physiol. 2010. Vol. 45. N 1. P. 79–95.
20. Tschalkner A., Gärtner G., Kofler W. *Coelastrella aeroterrestica* sp. nov. (Chlorophyta, Scenedesmoideae) a new, obviously often overlooked aeroterrestrial species // Algal. Stud. 2008. Vol. 128. P. 11–20.
21. Darienko T., Gustavs L., Pröschold T. Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach // J. Physiol. 2016. Vol. 52. N 6. P. 1125–1145.
22. Fucíková C., Lewis L.E. Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta) // Fottea. 2012. Vol. 12. N 1. P. 83–93.
23. Petersen J.B. Einige neue Erdalgen // Arch. Protested. 1932. Vol. 76. P. 395–408.

24. Temraleeva A.D., Krivina E.S., Boldina O.N. *Edaphochloris* gen. nov.: a new genus of soil green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with simple morphology // Plant Syst. Evol. 2022. Vol. 308. N 1: 4.

25. Yamamoto M., Nishikawa T., Kajitani H., Kawano S. Patterns of asexual reproduction in *Nannochloris bacillaris* and *Marvania geminata* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Planta. 2007. Vol. 226. N 4. P. 917–927.

26. Somogyi B., Felföldi T., Solymosi K., Flieger K., Márialigeti K., Böddi B., Vörös L. One step closer to eliminating the nomenclatural problems of minute coccoid green algae: *Pseudochloris wilhelmii*, gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Eur. J. Phycol. 2014. Vol. 48. N 4. P. 427–436.

27. Keller A., Schleicher T., Förster F., Ruderisch B., Dandekar T., Müller T., Wolf M. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales) // BMC Evol. Biol. 2008. Vol. 8: 218.

28. Decelle J., Romac S., Sasaki E., Not F., Mahé F., Lovejoy C. Intracellular diversity of the V4 and V9 regions of the 18S rRNA in marine protists (Radiolarians) assessed by high-throughput sequencing // PLoS One. 2014. Vol. 9. N 8: e104297.

Поступила в редакцию 25.03.2022

После доработки 03.07.2022

Принята в печать 27.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Morphological and molecular genetic analysis of green microalgal strains isolated from commercial biological products based on “living *Chlorella*”

E.S. Krivina* , A.D. Temraleeva 

Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,
prosp. Nauki 3, Pushchino, 142290, Russian Federation

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

In the present study, *Chlorella*-like strains of green microalgae from various commercial biological products were studied for the first time using morphological and molecular genetic analyses. It was found that representatives of the *Chlorella* clade or sister *Parachlorella* clade were present in all analyzed samples. In addition, microalgae from the genera *Edaphochlorella*, *Chloroidium*, *Edaphochloris* and *Muriella* belonging to the Trebouxiophyceae class, as well as *Coelastrella* and *Chromochloris* belonging to the Chlorophyceae class were found. According to direct light microscopy data, filamentous cyanobacteria were observed in all preparations, and the presence of diatoms was also noted in the biopreparation “Gera”. Since the correct identification of green microalgae based on phenotypic traits is very difficult due to their scarcity, lack of information and variability, the control of the composition of microalgae in biological products should be carried out using modern molecular genetic methods.

Keywords: biological products, *Chlorella*-like algae, morphology, phylogeny, identification, species richness, cryptic species

Funding: The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project number 19-34-60002.

Сведения об авторах

Кривина Елена Сергеевна — канд. биол. наук, и.о. науч. сотр. группы «Альгологическая коллекция АСССИ», ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Тел.: 8-496-773-86-33; e-mail: pepelisa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0849-5832>

Темралева Анна Диссенгалиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., руководитель группы «Альгологическая коллекция АСССИ», ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Тел.: 8-496-773-86-33; e-mail: temraleeva.anna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3445-0507>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.32/.36

Наночастицы полимера молочной кислоты с рифампицином снижают активность мультилекарственного транспортера Р-gr в макрофагах человека

М.В. Ерохина^{1, 2, *} , Е.Н. Павлова¹ , Е.К. Тарасова² , А.В. Курынина¹,
Д.М. Поташникова¹ , Л.Н. Лепеха² , А.Э. Эргешов² , Г.Е. Онищенко¹

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

²Отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Россия, 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

*e-mail: masha.erokhina@gmail.com

В настоящее время проблему снижения эффективности действия противотуберкулезных препаратов связывают не только с развитием лекарственной устойчивости у возбудителя, но и с функциональной активностью белка множественной лекарственной устойчивости клеток макроорганизма Р-гликопротеина (Р-glycoprotein, Р-gr). Один из основных противотуберкулезных препаратов – рифампицин (РИФ) – является субстратом для Р-gr, что снижает его эффективность. В статье представлены данные об активности Р-gr в провоспалительных макрофагах человека и проведена оценка влияния на его активность новой формы РИФ, инкапсулированного в наночастицы полимера молочной кислоты, разрешенного для медицинского применения. Показано, что макрофаги ТНР-1, в отличие от исходных клеток, характеризуются возрастанием функциональной активности Р-gr в процессе дифференцировки, а также сохранением жизнеспособности в присутствии РИФ, что связано с активацией Р-gr. Новая форма РИФ является нетоксичной для моноцитов и макрофагов ТНР-1 в сравнении с традиционной формой. При использовании инкапсулированной формы РИФ происходят активация процесса эндоцитоза/фагоцитоза в макрофагах и снижение функциональной активности Р-gr. Полученные данные демонстрируют, что создание инкапсулированных противотуберкулезных препаратов – активаторов фагоцитоза, направленно снижающих активность Р-gr и таким образом влияющих на функциональные особенности макрофагов человека, представляется перспективным и актуальным направлением для повышения эффективности действия противотуберкулезных препаратов.

Ключевые слова: Р-gr, полимер молочной кислоты, наночастицы, рифампицин, провоспалительные макрофаги, туберкулез

Развитие нанотехнологий позволяет создавать лекарственные препараты, обладающие не только новыми физико-химическими свойствами, по сравнению с их традиционными формами, но и влияющие на функциональную активность клеток-мишеней. В связи с ростом числа случаев туберкулеза легких с множественной и широкой лекарственной устойчивостью перспективным направлением является разработка новых форм противотуберкулезных препаратов (ПТП) [1, 2]. Следует отметить, что в настоящее время проблеме снижения эффективности действия ПТП связывают не только с развитием лекарственной устойчивости у возбудителя *Mycobacterium tuberculosis*, но и с функциональной активностью белка множественной лекарственной устойчивости соматических клеток макроорганизма Р-гликопротеина (Р-glycoprotein, Р-gr). Ранее

нами было показано, что в процессе развития туберкулезного воспаления происходит возрастание экспрессии гена белка Р-gr (*MDR1/Mdr1*) в клетках легких [3, 4]. Р-gr локализуется преимущественно на плазматической мембране и, используя энергию АТФ, связывает широкий спектр субстратов, в том числе и ПТП рифампицин (РИФ) [5]. В связи с этим создание технологий ингибирования Р-gr в клетках человека в целях увеличения внутриклеточной концентрации РИФ является важной фундаментальной и клинической задачей. Один из подходов такого ингибирования связан с активацией эндоцитоза, так как известно, что в процессе эндоцитоза происходит интернализация Р-gr и снижение его функциональной активности [6]. Способы активации интернализации Р-gr в настоящее время разрабатываются при доставке лекарств через гематоэнцефалический ба-

рьер для повышения их эффективности [7]. При этом разновидность эндоцитоза — фагоцитоз — является фундаментальным свойством макрофагов, позволяющим им бороться с возбудителем. В свою очередь, макрофаги — ключевые клетки для адресной доставки РИФ.

Создание инкапсулированных препаратов на основе полимера молочной кислоты (ПМК) и РИФ находится в фокусе внимания современной фармакологии [2]. В отличие от свободного РИФ, проникающего в клетки путем диффузии, наночастицы (НЧ) РИФ-ПМК попадают в макрофаги путем эндоцитоза/фагоцитоза [8, 9]. В фагосомах и фаголизосомах полимер деградирует, в результате чего высвобождается РИФ в свободной форме. Так как *M. tuberculosis* персистирует в фагосомах, то идеология создания НЧ РИФ-ПМК предполагает его более эффективное воздействие на внутриклеточные формы *M. tuberculosis* за счет адресной доставки и создания более высокой внутриклеточной концентрации препарата, чем в случае традиционной формы РИФ. Следует отметить, что как активность самого P-gr в макрофагах, так и влияние на него НЧ РИФ-ПМК до сих пор недостаточно изучены. В связи с этим целью данной работы являлись изучение активности P-gr и оценка влияния НЧ РИФ-ПМК на его функциональную активность в макрофагах человека. ПМК разрешен к медицинскому применению, что является его серьезным преимуществом перед другими формами биоразлагаемых полимеров [10]. В работе использовали клетки линии ТНР-1, которые являются хорошо изученной моделью для индукции макрофагальной дифференцировки под воздействием форболового эфира [11, 12]. В данной работе мы использовали модель провоспалительных макрофагов ТНР-1, характеризующихся высоким уровнем секреции провоспалительных цитокинов и фагоцитозом через Fc-рецепторы [13].

Материалы и методы

Культивирование клеток ТНР-1 проводили на среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM глутамин. Для индукции макрофагальной дифференцировки клетки ТНР-1 обрабатывали форболовым эфиром в концентрации 100 нМ, как было описано ранее [13].

РИФ-ПМК был разработан в НИИ Молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (патент RU2418585C1) и любезно предоставлен проф. Г.Г. Барсегяном. Согласно данным разработчика, средний размер частиц, измеренный с использованием метода автокорреляционной спектроскопии, равен 378 ± 84 нм. Доля РИФ в препарате составляет 8–10% (в среднем 8,5% по массе).

Определение цитотоксического действия РИФ и НЧ РИФ-ПМК на клетки линии ТНР-1 проводи-

ли с помощью МТТ-теста. Клетки засевали в 96-луночный планшет в концентрации 30000 клеток на лунку и культивировали в течение 4 сут. Были выбраны следующие экспериментальные концентрации препаратов: 10 и 25 мкг/мл РИФ и 100 или 250 мкг/мл НЧ РИФ-ПМК. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия) при длине волны 530 нм. Значения ОП для контроля принимали за 100%. В каждом эксперименте использовали три технических повтора, было проведено пять независимых экспериментов. Для технических повторов использовали средние значения, результаты МТТ-теста представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение.

Функциональную активность P-gr оценивали по выбросу клетками классического субстрата — флуоресцентного красителя родамина 123 [14]. Клетки инкубировали с красителем в концентрации 5 мМ в темноте при 4°C 20 мин, затем культуральную среду меняли и клетки инкубировали 30 мин при 37°C в присутствии агентов. Для оценки функциональной активности P-gr, а также влияния исследуемых препаратов на выброс родамина 123 использовали параметр фактора активности P-gr (ΦA_{P-gr}), который рассчитывали по формуле:

$$\Phi A_{P-gr} = 100 \times [(\text{МИФ}_{\text{винбластина}} - \text{МИФ}_{\text{выброса родамина 123}}) / \text{МИФ}_{\text{винбластина}}],$$

где $\text{МИФ}_{\text{винбластина}}$ — показатель медианы интенсивности флуоресценции родамина 123 в макрофагах в присутствии винбластина в концентрации 22 мМ, который полностью ингибирует функциональную активность P-gr [14]. $\text{МИФ}_{\text{выброса родамина 123}}$ — интенсивность флуоресценции выброса родамина 123 в клетках в присутствии исследуемых агентов или без них. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSaria SORP (BD BioSciences, США) со встроенным аргонным лазером 488 нм и фильтром BP 530/30 нм с помощью программного обеспечения FACSDiva (версия 8.0.1, BD BioSciences, США). Для каждого эксперимента записывали 30000 событий. Значения ΦA_{P-gr} представлены как средние $\pm$ стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов.

Конститутивный фагоцитоз в культуре клеток ТНР-1 изучали с помощью анализа поглощения ими в течение 3 ч немеченых латексных шариков (диаметром 0,5 мкм, 0,005%, Invitrogen, США) на 1-е, 3-и и 7-е сут дифференцировки. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и фиксировали 4%-ным параформальдегидом (MP Biochemicals, Франция) в течение 20 мин при 4°C. Затем проводили пермеабиллизацию 0,1%-ным Triton X-100 в течение 5 мин при 20°C и окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ-фаллоидин, Sigma-Aldrich, США) в течение 40 мин,

затем трижды промывали ФСБ по 5 мин и заключали препараты в монтажную среду (Mowiol 4-88, Sigma-Aldrich, США), содержащую 100 нМ 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида (DAPI, Sigma-Aldrich, США).

Фагоцитарную активность клеток ($n = 200$ в каждом эксперименте) оценивали по следующим параметрам: 1) фагоцитарный индекс (ФИ, процент клеток, начавших фагоцитоз); 2) фагоцитарное число (ФЧ, среднее число поглощенных шариков на клетку); 3) доля активно фагоцитирующих клеток (АФ-клетки, в цитоплазме выявляются 20 и более латексных шариков). Клетки анализировали при помощи сканирующего конфокального микроскопа TCS SPE (Leica, Германия) с набором лазеров (405, 488, 532 нм) и соответствующими фильтрами (RT 30/70, DD 405/532, DD 488/635). Изображения клеток получали, используя объективы с увеличением $\times 40$ и $\times 63$, и анализировали в программе LAS AF (версия 3.2, Leica, Германия). Проводили четыре независимых эксперимента.

Для сканирующей электронной микроскопии одну каплю суспензии НЧ ПМК или НЧ РИФ-ПМК помещали на покровное стекло и высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Клетки после воздействия 100 мкг/мл НЧ ПМК или 100 мкг/мл НЧ РИФ-ПМК в течение 4 сут фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом (Ted Pella, США) с добавлением 2%-ного параформальдегида на ФСБ в течение 1 ч, обезвоживали в восходящих концентрациях этилового спирта по следующей схеме: $30^\circ - 40^\circ - 50^\circ - 60^\circ - 70^\circ - 80^\circ$ и 96° , затем помещали в смесь ацетона и этилового спирта в необходимых пропорциях (3:1, 1:1, 1:3), а затем — в чистый ацетон. После обезвоживания образцы подвергали сушке в критической точке в атмосфере CO_2 (31°C , 73,8 бар), покрывали платиной и золотом, а затем анализировали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6380 LA (Jeol, Япония), 20 кВ.

Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 10 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, CA, США). Для сравнения независимых выборок использовали критерий Стьюдента. Различия между группами признавали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Характеристика модели клеток ТНР-1 при макрофагальной дифференцировке. Макрофагальная дифференцировка клеток ТНР-1 сопровождается изменением их морфологии от моноцитоподобной до веретенообразной (рис. 1). Оценка фагоцитарной активности показала, что на 1 сут макрофагальной дифференцировки ФИ составляет $25 \pm 4,5\%$, а на 3-и и 7-е сут — $75 \pm 5\%$ и $85 \pm 1,5\%$ соответственно. На 7-е сут возрастает и значение ФЧ — до 30,59 шариков на клетку (на 3-и сут ФЧ равно 6,62), а также увеличивается доля АФ-клеток до $41 \pm 2\%$ по сравнению с 3 сут макрофагальной дифференцировки ($5 \pm 2\%$). Таким образом, в процессе макрофагальной дифференцировки происходит активация конститутивного фагоцитоза.

Уже через сутки дифференцировки в макрофагах ТНР-1 отмечено присутствие Р-гр с максимумом функциональной активности на 3-и сут, сохраняющимся в течение всего периода эксперимента, до 7-х сут (таблица). Таким образом, в макрофагальных клетках, в отличие от исходных моноцитарных, экспрессируется Р-гр, который обладает высокой функциональной активностью. Эти данные определили выбранный диапазон эксперимента: препараты добавляли в среду культивирования на 3-и сут дифференцировки клеток, и дальнейшую инкубацию с препаратами проводили в течение 4-х сут (до 7-х сут дифференцировки).

Влияние РИФ и НЧ РИФ-ПМК на макрофаги ТНР-1. Как показали данные электронной микроскопии, размер НЧ ПМК и РИФ-ПМК преимущественно находится в диапазоне 50–400 нм (рис. 2, А и Б).

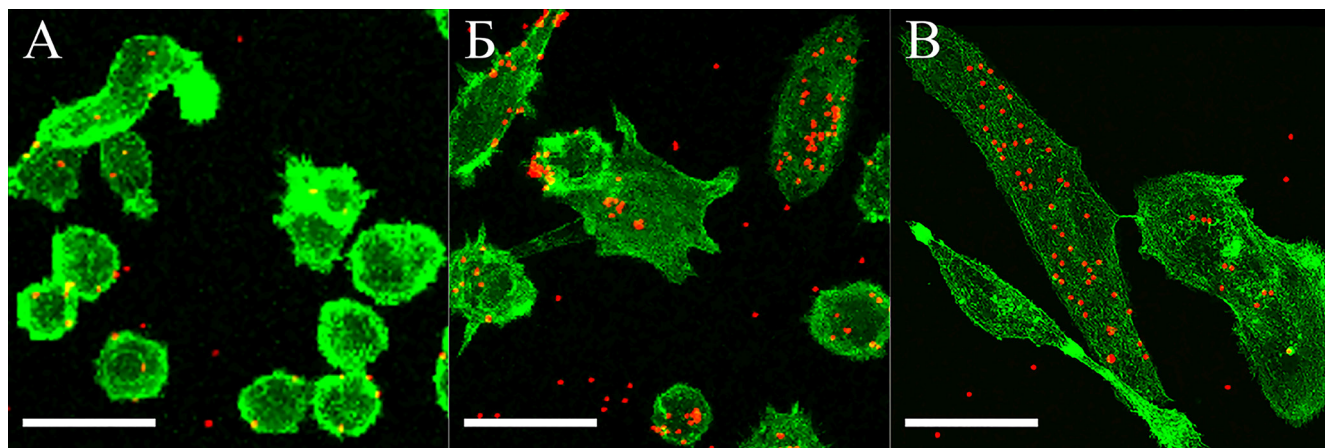


Рис. 1. Морфологическая и фагоцитарная характеристика макрофагов ТНР-1. А — 1-е сут; Б — 3-и сут, В — 7-е сут. Красный цвет — латексные шарики; диаметр 0,5 мкм; зеленый цвет — актиновые микрофиламенты, окрашенные ФИТЦ-фаллоидином. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок — 20 мкм.

Контрольные макрофаги ТНР-1 имеют преимущественно сглаженный рельеф поверхности. Могут выявляться одиночные складки или филоподии размером до 1 мкм (рис. 2, В). Воздействие РИФ в концентрации 10 мкг/мл не активирует поверхность клеток (не отличается от контроля) (рис. 2, Г), в то время как при воздействии ПМК НЧ и РИФ-ПМК НЧ образуются многочисленные выросты и складки по всей поверхности клеток (рис. 2, Д и Е). В целом, при действии НЧ регистрируется активация клеточной поверхности с формированием многочисленных филоподий размером до 4 мкм, раффлов, складок и фагоцитарных чаш. Эти изменения свидетельствуют об активации процесса эндоцитоза/фагоцитоза под воздействием как НЧ ПМК, так и НЧ РИФ-ПМК.

Для НЧ ПМК показаны разные механизмы поступления в клетки. Так, предполагается, что может быть задействован эндоцитоз с образованием кавеол [7]. На клетках эпителия легкого линии A549 показано, что НЧ ПМК меньше 100 нм по-

ступают в цитоплазму через клатрин-опосредованный эндоцитоз (если плазматическая мембрана богата фосфолипидами), либо через области липидных рафтов (при высоком содержании сфинголипидов и холестерина) [9]. Для препарата на основе сополимера молочной кислоты с гликолевой, в состав которого включен РИФ, показано, что в макрофаги красного костного мозга и мышинные макрофаги линии Raw 264.7 он поступает фагоцитозом и в дальнейшем выявляется в фаголизосомах [14], где полимер деградирует. Это приводит к высвобождению лекарственного агента и его частичной диффузии в цитоплазму [8]. Деградация ПМК осуществляется за счет действия фосфатаз и лактатдегидрогеназ макрофагов [15] и происходит в течение 10–15 сут [16], при этом низкий pH лизосом ускоряет данный процесс [17]. Таким образом, после фагоцитоза НЧ РИФ-ПМК не происходит резкого накопления свободного РИФ в клетках. Это является важным для обеспечения жизнеспособности клеток, так как извест-

Таблица

Изменение ΦA_{P-gr} в макрофагах при дифференцировке и действии ПМК НЧ НЧ

Дифференцировка ТНР-1, сут				Дифференцировка ТНР-1, 7-е сут		
				агент		
0	1	3	7	РИФ-ПМК	ПМК	РИФ
ΦA_{P-gr}						
—	34,1±1,1	74,9±10,8* Δ	75,3±8,3* Δ	42,6±17,3* $\diamond$	66,4±3,8* $\diamond$	65,5±10,2

ΦA_{P-gr} = средние значения $\Phi A_{P-gr} \pm$ стандартное отклонение по результатам трех экспериментов

Примечание: Δ — в сравнении с 1 сут дифференцировки; $\diamond$ — в сравнении с 7 сут дифференцировки; * — различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$.

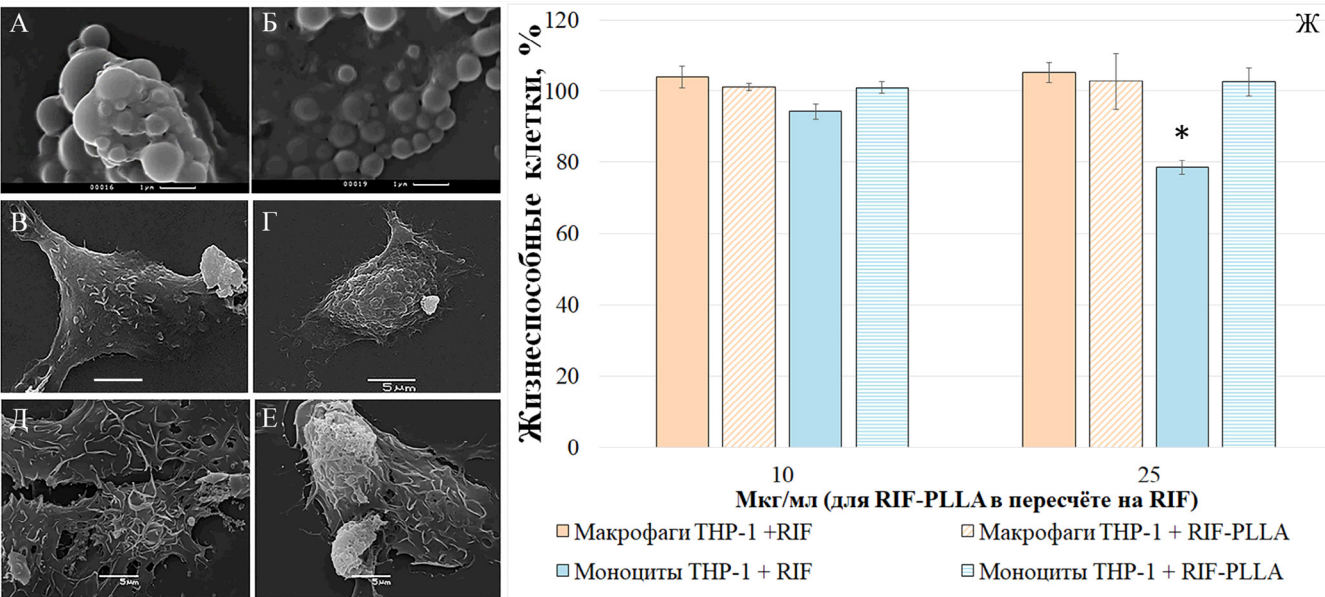


Рис 2. Влияние ПМК НЧ и РИФ-ПМК НЧ на макрофаги ТНР-1. А – ПМК НЧ, Б – РИФ-ПМК НЧ; В–Е – клетки ТНР-1 после воздействия РИФ, ПМК НЧ и РИФ-ПМК НЧ (4 сут): В – контроль; Г – РИФ (10 мкг/мл); Д – РИФ-ПМК НЧ (100 мкг/мл); Е – ПМК НЧ (100 мкг/мл). Сканирующая электронная микроскопия. Масштабный отрезок: А, Б – 1 μ м, В–Е – 5 μ м. Ж – гистограмма выживаемости моноцитов и макрофагов ТНР-1 (МТТ-тест) при действии 10 и 25 мкг/мл РИФ либо 100 и 250 мкг/мл РИФ-ПМК НЧ (на гистограмме концентрации указаны в пересчете на РИФ). Даны средние значения $\pm$ стандартное отклонение по результатам пяти экспериментов. * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

но, что в клетках млекопитающих РИФ может индуцировать апоптоз, вызывая патологию митохондрий и окислительный стресс [18, 19].

Для оценки токсичности НЧ РИФ-ПМК использовали препарат в концентрациях, которые соответствуют концентрациям РИФ, выявляемым в крови больных туберкулезом легких и в области туберкулезного воспаления [20]. В присутствии НЧ РИФ-ПМК с помощью МТТ-теста не было выявлено снижения жизнеспособности моноцитарных и макрофагальных клеток ТНР-1 (рис. 2, Ж), что совпадает с данными других авторов [2, 21–23]. При этом сравнительный анализ показал, что традиционный РИФ является токсичным для исходной клеточной линии ТНР-1 и нетоксичным для макрофагальных клеток. Эти различия можно объяснить присутствием в макрофагах Р-гр, субстратом которого является РИФ [24].

Влияние НЧ РИФ-ПМК на активность Р-гр в макрофагах ТНР-1. Анализ накопления родамина 123, его выброса и ингибирования показал, что в процессе дифференцировки макрофагов ТНР-1 возрастают значения ΦA_{P-gr} на 1-е и 3-и сут дифференцировки с дальнейшей стабилизацией данного параметра к 7-м сут (таблица). Анализ влияния НЧ РИФ-ПМК в концентрации 100 мкг/мл (содержит 10 мкг/мл РИФ) на активность Р-гр выявил, что значение ΦA_{P-gr} ниже по сравнению с контролем.

Чем ниже значение ΦA_{P-gr} , тем в большей степени лекарственное средство оказывает ингибирующее влияние на функциональную активность Р-гр. Таким образом, более низкие значения ΦA_{P-gr} при воздействии НЧ РИФ-ПМК можно объяснить активацией эндоцитоза/фагоцитоза в экспериментальных клетках. Согласно имеющимся данным, активация эндоцитоза способствует «уходу» Р-гр с плазматической мембраны в эндосомы/фагосомы. Это сокращает количество Р-гр на плазматической мембране клеток и приводит к снижению выброса родамина 123, т.е. к ингибированию функциональной активности Р-гр. При этом НЧ ПМК также снижают ΦA_{P-gr} , но в меньшей степени, чем НЧ РИФ-ПМК. Имеются данные, что физико-химические свойства НЧ влияют на активность Р-гр, изменяя свойства не только плазматической мембраны, но и мембран синтетического аппарата клетки, а также посттрансляционные механизмы, что приводит к снижению количества функционально активного Р-гр [25, 26]. Схожие результаты — ингибирование НЧ РИФ-

ПМК выброса родамина 123 — нами были получены в краткосрочных экспериментах на миелоцитарных клеточных линиях человека KG1 и K562/i-S9, которые также характеризуются высокой экспрессией гена *MDR1* [27, 28]. Учитывая, что Р-гр является АТФ-зависимым транспортером, возможно, что снижение его функциональной активности связано с истощением внутриклеточных запасов АТФ в ходе активации фагоцитоза, необходимого для транспорта НЧ ПМК [7]. Свойства полимерных частиц, предназначенных для применения при заболеваниях легких, зависят от химического состава, их размера, формы, заряда [29]. Мы предполагаем, что РИФ в составе ПМК может придавать новые свойства НЧ, которые оказывают более выраженное влияние на активность Р-гр по сравнению с воздействием только НЧ ПМК.

Таким образом, нами показано, что: (1) макрофагальная дифференцировка клеток ТНР-1 сопровождается повышением функциональной активности Р-гр; (2) такие клетки характеризуются сохранением жизнеспособности в присутствии терапевтической концентрации РИФ, в отличие от моноцитарных клеток; (3) НЧ РИФ-ПМК нетоксичны для моноцитов и макрофагов ТНР-1; (4) НЧ РИФ-ПМК снижают функциональную активность Р-гр.

При использовании инкапсулированных форм препаратов происходит активация процесса фагоцитоза в макрофагах, что играет важную роль в борьбе с возбудителем туберкулеза. В то же время, при фагоцитозе может происходить снижение функциональной активности Р-гр. Таким образом, нам представляется перспективным и актуальным разработка инкапсулированных ПТП — активаторов фагоцитоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-34-90161), а также как часть научно-исследовательского проекта государственного задания ФГБНУ ЦНИИТ (№ 122041100257–9) и МГУ (№ 121032300098–5). Работа по цитометрическому анализу клеток поддержана программой развития МГУ (комплекс для клеточной сортировки на базе FACSARIA SORP). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park M., Satta G., Kon O.M. An update on multidrug-resistant tuberculosis // Clin. Med. 2019. Vol. 19. N 2. P. 135–139.
2. Guoping Y., Guofu W., Liting L., Kaixin Z., Xiaowen C., Yue C. Protective effect of rifampicin loaded by HPMA-PLA nanopolymer on macrophages infected with

Mycobacterium tuberculosis // Comput. Math. Methods Med. 2022. Vol. 2022: 784283.

3. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Рыбалкина Е.Ю., Никоненко Б.В., Бочарова И.В., Эргешов А.Э. Возрастное изменение экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости *MDR1A/B* в клетках легких мышей, ин-

фицированных *M. tuberculosis* // Вестник ЦНИИТ. 2019. № 2. С. 16–25.

4. Erokhina M., Lepekha L., Rybalkina E., Pavlova E., Tarasov R., Krasnikova E., Ergeshov A. Expression of MDR1 gene encoding P-glycoprotein is significantly increased in active pulmonary tuberculomas // Eur. Respir. J. 2021. Vol. 58. Suppl. 65: PA2467.

5. Jouan E., Le Vee M., Denizot C., Da Violante G., Fardel O. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2 // Fundam. Clin. Pharmacol. 2014. Vol. 28. N 1. P. 65–77.

6. Kim H., Barroso M., Samanta R., Greenberger L., Sztul E. Experimentally induced changes in the endocytic traffic of P-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells // Am. J. Physiol. 1997. Vol. 273. N 2. P. 687–702.

7. Chen J., Cao L., Cui Y., Tu K., Wang H., Wang L. The exploration of endocytic mechanisms of PLA-PEG nanoparticles prepared by coaxial tri-capillary electrospray-template removal method // Colloids Surf. B. 2018. Vol. 161. P. 10–17.

8. Kalluru R., Fenaroli F., Westmoreland D., et al. Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes // J. Cell Sci. 2013. Vol. 126. Pt. 14. P. 3043–3054.

9. da Luz C.M., Boyles M.S., Falagan-Lotsch P., Pereira M.R., Tutumi H.R., de Oliveira Santos E., Martins N.B., Himly M., Sommer A., Foissner I., Duschl A., Granjeiro J.M., Leite P.E.C. Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts // J. Nanobiotechnology. 2017. Vol. 15: 11.

10. Vasir J.K., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. Vol. 59. N 8. P. 718–728.

11. Grigoryeva O.A., Korovina I.V., Gogia B.Sh., Sysoeva V.Yu. Migration properties of adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells cocultured with activated monocytes *in vitro* // Cell Tissue Biol. 2014. Vol. 8. N 5. P. 359–367.

12. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide // BMC Cancer. 2015. Vol. 15: 577.

13. Kuryina A., Erokhina M., Makarevich O., Sysoeva V., Lepekha L., Kuznetsov S., Onishchenko G. Plasticity of human THP-1 cell phagocytic activity during macrophagic differentiation // Biochem. 2018. Vol. 83. N 3. P. 200–214.

14. Mechetner E., Kyshtobayeva A., Zonis S., Kim H., Stroup R., Garcia R., Parker R.J., Fruehauf J.P. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with *in vitro* resistance to taxol and doxorubicin // Clin. Cancer Res. 1998. Vol. 4. N 2. P. 389–398.

15. da Silva D., Kaduri M., Poley M., Adir O., Krinsky N., Shainsky-Roitman J., Schroeder A. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems // Chem. Eng. J. 2018. Vol. 340. P. 9–14.

16. Cardoso M.M., Peca I. N., Lopez T., Gardner R., Bicho A. Double-walled poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) nanoparticles for the sustained release of doxorubicin // Polymers (Basel). 2021. Vol. 13. N 19: 3230.

17. Elmowafy E.M., Tiboni M., Soliman M.E. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and

nanoparticles // J. Pharm. Investig. 2019. Vol. 49. N 4. P. 347–380.

18. Erokhina M., Kuryina A., Onishchenko G. Mitochondria are targets for the antituberculosis drug rifampicin in cultured epithelial cells // Biochemistry (Mosc.). 2013. Vol. 78. N 10. P. 1155–1163.

19. Cahill C., Phelan J.J., Keane J. Understanding and exploiting the effect of tuberculosis antimicrobials on host mitochondrial function and bioenergetics // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020. Vol. 10: 493.

20. Ait Moussa L., El Bouazzi O., Serragui S., Soussi Tanani D., Soulaymani A., Soulaymani R. Rifampicin and isoniazid plasma concentrations in relation to adverse reactions in tuberculosis patients: a retrospective analysis // Ther. Adv. Drug Saf. 2016. Vol. 7. N 6. P. 239–247.

21. Basarkar A., Devineni D., Palaniappan R., Singh J. Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly (DL-lactide-co-glycolide) and poly (DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA // Int. J. Pharm. 2007. Vol. 343. N 1–2. P. 247–254.

22. Mattu C., Pabari R. M., Boffito M., Sartori S., Ciardelli G., Ramtoola Z. Comparative evaluation of novel biodegradable nanoparticles for the drug targeting to breast cancer cells // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013. Vol. 85. N 3. Pt. A. P. 463–472.

23. Moorkoth D., Nampoothiri K.M. Synthesis, colloidal properties and cytotoxicity of biopolymer nanoparticles // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. Vol. 174. N 6. P. 2181–2194.

24. He H., Buckley M., Britton B., Mu Y., Warner K., Kumar S., Cory T. J. Polarized macrophage subsets differentially express the drug efflux transporters MRP1 and BCRP, resulting in altered HIV production // Antivir. Chem. Chemother. 2018. Vol. 26: 2040206617745168.

25. Gopisetty M.K., Kovács D., Igaz N., Rónavári A., Béltéky P., Rázga Z., Venglovicz V., Csoboz B., Boros I.M., Kónya Z., Kiricsi M. Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells // J. Nanobiotechnology. 2019. Vol. 17. N 1: 9.

26. Davis T.P., Sanchez-Covarubias L., Tome M.E. P-glycoprotein trafficking as a therapeutic target to optimize CNS drug delivery // Adv. Pharmacol. Sci. 2014. Vol. 71. P. 25–44.

27. Erokhina M., Rybalkina E., Barsegyan G., Onishchenko G., Lepekha L. The toxicity of rifampicin polylactic acid nanoparticles against *Mycobacterium bovis* BCG and human macrophage THP-1 cell line // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, (vol. 98, N 1, 012017). IOP Publishing, 2015.

28. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Рыбалкина Е.Ю., Павлова Е.Н., Онищенко Г.Е. Влияние рифампицина и его инкапсулированной формы на функциональную активность белка множественной лекарственной устойчивости Pgp в миелоидных клетках человека // Вестник ЦНИИТ. 2018. Т. 2. № 2. С. 28–39.

29. Lim Y.H., Tiemann K.M., Hunstad D.A., Elsabahy M., Wooley K.L. Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol. 2017. Vol. 8. N 6. P. 842–871

Поступила в редакцию 17.05.2022

После доработки 28.07.2022

Принята в печать 29.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Nanoparticles of lactic acid polymer with rifampicin decrease activity of multi-drug transporter P-gp in human macrophages

M.V. Erokhina^{1, 2, *} , E.N. Pavlova¹ , E.K. Tarasova² , A.V. Kurynina¹,
D.M. Potashnikova¹ , L.N. Lepekha² , A.E. Ergeshov² , G.E. Onishchenko¹

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

²Department of Pathomorphology, Central Tuberculosis Research Institute, 2 Yauzskaya alleya, Moscow, 107564, Russia

*e-mail: masha.erokhina@gmail.com

Currently, the problem of effectiveness reduction of the anti-tuberculosis drugs is associated not only with the development of drug resistance by the pathogen, but also with the activity of the multidrug resistance protein P-gp (P-glycoprotein) of macroorganism cells. Rifampicin, the main anti-tuberculosis drug, is a substrate for P-gp. The article presents data on the activity of P-gp in pro-inflammatory human macrophages and assesses the effect of a new form of the anti-tuberculosis drug – rifampicin-loaded lactic acid polymer nanoparticles – on it. Scanning electron microscopy, laser confocal microscopy, MTT test and flow cytometry methods were used. It was shown that the new form of rifampicin is non-toxic for human monocytes and macrophages of the THP-1 cell line. In addition, it activates the processes of endocytosis/phagocytosis and reduces the functional activity of P-gp. Thus, it seems promising to develop encapsulated anti-tuberculosis drugs – with phagocytosis-activating properties that specifically affect certain features of human macrophages.

Keywords: *P-gp, poly-l-lactic acid nanoparticles, rifampicin, proinflammatory macrophages, tuberculosis*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-34-90161. The research was carried out as part of the scientific project of the state order of the Government of Russian Federation to Central Tuberculosis Research Institute (project number 122041100257-9) and Lomonosov Moscow State University (project number 121032300098-5). The work on cytometric analysis of cells was supported by the Moscow State University development program (a complex for cell sorting based on FACSaria SORP).

Сведения об авторах

Ерохина Мария Владиславовна — докт. биол. наук, доц. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ, зав. лабораторией клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: masha.erokhina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7256-4679>

Павлова Екатерина Николаевна — аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: guchia@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5662-3715>

Тарасова Екатерина Константиновна — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: shalioto6@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0438-7233>

Курынина Анна Викторовна — старший преподаватель кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: frasska@gmail.com

Поташикова Дарья Марковна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-20-84; e-mail: dariapotashnikova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0098-827X>

Лепеха Лариса Николаевна — проф., докт. биол. наук, гл. науч. сотр. отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: lep3@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6894-2411>

Эргешов Атаджан Эргешович — член-корр. РАН, проф., докт. мед. наук, директор ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-19; e-mail: cniit@ctri.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5669-5345>

Онищенко Галина Евгеньевна — проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-94; e-mail: galina22@mail.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 591.112.1

**Характеристики быстрого натриевого тока
в изолированных кардиомиоцитах перепела****Т.С. Филатова^{1, *}, Д.В. Абрамочкин^{1, 2}**

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

²*Лаборатория электрофизиологии сердца, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,
Россия, 121552, г. Москва, ул. Черепковская 3-я, д. 15а*

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

Быстрый натриевый ток (I_{Na}) обеспечивает деполяризацию рабочего миокарда, определяя возбудимость его клеток и скорость распространения возбуждения. Нарушения активации и инактивации каналов натриевого тока могут приводить к развитию различных аритмий. У большинства позвоночных, за исключением млекопитающих, I_{Na} исследован достаточно слабо — в том числе и у птиц, представляющих большой интерес для сравнительной физиологии. Данная работа впервые рассматривает характеристики быстрого натриевого тока в миокарде взрослых птиц. С использованием метода пэтч-кламп мы зарегистрировали I_{Na} в изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах японского перепела. Ток имел большую амплитуду (в сравнении с другими позвоночными) и быстро восстанавливался после инактивации; быстрая временная константа инактивации I_{Na} в предсердных миоцитах оказалась меньше, чем в желудочковых. Параметры стационарной активации и инактивации позволяют предположить меньшую выраженность оконного натриевого тока в миокарде птиц по сравнению с таковым в миокарде млекопитающих. В желудочковых кардиомиоцитах перепела блокатор позднего натриевого тока ранолазин вызывал слабое снижение пиковой амплитуды I_{Na} и не менял кинетику инактивации, однако сдвигал кривую стационарной активации в сторону более отрицательных потенциалов, укорачивал потенциалы действия и снижал максимальную скорость нарастания их переднего фронта. Таким образом, можно предполагать, что данные характеристики I_{Na} в миокарде перепела отражают адаптацию к высокой частоте сокращений сердца птиц и могут указывать на возможные различия в структуре и функционировании натриевых каналов в сердцах птиц и млекопитающих.

Ключевые слова: *птицы, миокард, изолированные кардиомиоциты, быстрый натриевый ток, пэтч-кламп, ранолазин*

Быстрый натриевый ток (I_{Na}) опосредует вход ионов натрия внутрь клетки, обеспечивая быструю деполяризацию в фазе 0 потенциала действия (ПД) и определяя возбудимость ткани, а также характер и скорость проведения возбуждения. Многообразие аритмий, связанных с нарушениями натриевого тока, указывает на его исключительную важность для работы сердца [1]. Современные модели, описывающие функционирование натриевых каналов, включают 10 и более состояний каналов, а вспомогательные субъединицы могут дополнительно изменять кинетические и стационарные характеристики канала [2–4]. Доступность натриевых каналов и возбудимость миокарда определяются динамическим взаимодействием активации и инактивации каналов. Нарушения этих процессов могут привести к появле-

нию позднего натриевого тока I_{NaL} , в основе которого может лежать как замедленная инактивация, так и реактивация части каналов. Поздний ток, дополнительно деполяризующий кардиомиоциты во время фаз плато и окончательной реполяризации ПД, провоцирует возникновение постдеполяризаций и re-entry, что делает актуальным поиск новых экспериментальных объектов для моделирования патологических состояний, связанных с усилением I_{NaL} , и способов их купирования [5]. В свете последних работ сердца птиц, благодаря сходному с человеческим набору ионных токов, рассматривается как перспективный модельный объект для исследований в области кардиологии [6]. Однако I_{Na} в миокарде птиц практически не изучен. В более ранних работах было показано, что I_{Na} появляется в миокарде эмбрио-

нов птиц на второй день развития, однако в ходе онтогенеза его характеристики меняются; была показана чувствительность I_{Na} в миокарде птиц к тетродотоксину [7, 8]. При этом, поскольку птицы в ходе эволюции независимо от млекопитающих приобрели гомойотермность и четырехкамерное сердце, способное сокращаться с большой частотой, можно ожидать, что электрическая активность их сердца и I_{Na} также претерпели соответствующие адаптационные изменения [9]. Настоящая работа ставила своей целью изучение кинетических и стационарных характеристик I_{Na} в сердце взрослых птиц, а также оценку потенциального участия позднего натриевого тока в электрической активности миокарда.

Материалы и методы

В работе использовали японских перепелов (*Coturnix japonica*, эстонская разновидность) обоих полов в возрасте 2–4 мес. с массой тела 250–350 г. Животные были получены с фермы «Орловский дворик» (г. Мытищи, Московская обл., Россия). Перед экспериментом животных содержали в течение 10 сут при световом режиме 12:12 с доступом *ad libitum* к воде и промышленному корму. Все процедуры соответствовали директиве 2010/63/EU по обращению с лабораторными животными. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией по биоэтике Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Изолированные кардиомиоциты перепела выделяли по описанной ранее методике [6]. Животным вводили гепарин в торакоабдоминальную полость (1000 МЕ/кг), после чего наркотизировали их изофлураном (3,5% во вдыхаемой смеси с O_2), проводили декаптацию, вскрывали торакоабдоминальную полость, вырезали сердце и помещали его на аппарат Лангендорфа для ретроградной перфузии. Сердце перфузировали несодержащим Ca^{2+} раствором для выделения (мМ): NaCl – 116; KCl – 4; NaH_2PO_4 – 1,7; $NaHCO_3$ – 25; $MgCl_2$ – 0,55; пируват натрия – 5; таурин – 20; глюкоза – 11; бычий сывороточный альбумин – 1 мг/мл; перфузию проводили при температуре 42°C; pH поддерживали на уровне 7,4 с помощью аэрации карбогеном (95% O_2 ; 5% CO_2). Спустя 5 мин после вымывания крови и остановки сердца перфузию переключали на раствор аналогичного состава, содержащий коллагеназу II (94 ед./мл, Worthington) и $CaCl_2$ (16 мМ). Спустя 35–45 мин, после проявления признаков разрушения соединительнотканного каркаса, предсердия и желудочки разделяли, помещали в раствор Kraftbrühe (мМ): $MgSO_4$ – 3; KCl – 30; KH_2PO_4 – 30; EGTA – 0,5; глутамат калия – 50; HEPES – 20; таурин – 20; глюкоза – 10 (pH 7,2 при 24°C), измельчали и пипетировали. Изолированные клетки в течение 8 ч

хранили в растворе Kraftbrühe и использовали для работы.

Ионные токи и потенциалы действия регистрировали в изолированных кардиомиоцитах методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell в режиме поддержания потенциала или тока. Эксперименты проводили при комнатной температуре (24°C). Клетки помещали в экспериментальную камеру и перфузировали модифицированным физиологическим раствором. Контакт с клеткой устанавливали не менее чем через 3 мин после начала перфузии; регистрацию тока проводили спустя не менее чем 1 мин после формирования контакта. Для регистрации I_{Na} использовали раствор следующего состава (мМ): NaCl – 20; Трис-Cl 120; CsCl – 5,4; $CaCl_2$ – 1,8; $MgCl_2$ – 1; глюкоза – 10; HEPES – 10; pH 7,4. Для подавления кальциевого тока в раствор добавляли нифедипин (10^{-5} М). Для регистрации ПД использовали следующий перфузионный раствор (мМ): NaCl – 150; KCl – 5,4; $CaCl_2$ – 1,8; $MgCl_2$ – 1,2; глюкоза – 10; HEPES – 10; pH 7,4. Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instruments, США). Пипеточный раствор для регистрации I_{Na} имел следующий состав (мМ): CsCl – 130; NaCl – 10; $MgCl_2$ – 1; EGTA – 5; Mg-АТФ – 4; Na_2 -ГТФ – 0,03; HEPES – 10; pH 7,2. Для регистрации ПД использовали следующий пипеточный раствор (мМ): KCl – 140; $MgCl_2$ – 1; EGTA – 5; Mg-АТФ – 4; Na_2 -ГТФ – 0,03; HEPES – 10; pH 7,2. Снижение движущей силы для Na^+ вкуче с 70% компенсацией последовательного сопротивления обеспечило стабильную регистрацию высокоамплитудного I_{Na} .

Амплитуду тока нормировали на емкость клетки и выражали в пА/пФ. Временную константу инактивации получали, используя стандартное биэкспоненциальное преобразование Чебышева в программной среде Clampfit 10.3 (Molecular Devices, США). Стационарную инактивацию тока оценивали как отношение тока при заданном потенциале предимпульса к его максимальной амплитуде (I/I_{max}). Стационарную активацию I_{Na} оценивали по соотношению проводимости g/g_{max} , где g определяется как:

$$g = \frac{I_V}{V - V_{rev}} \quad (1).$$

Зависимость полученных соотношений I/I_{max} и g/g_{max} от поддерживаемого потенциала выражали в виде функции Больцманна:

$$y = \frac{1}{1 + e^{\frac{V - V_{50}}{k}}} \quad (2),$$

где V – поддерживаемый мембранный потенциал, V_{50} – потенциал, при котором остаются доступными для активации 50% каналов.

Восстановление I_{Na} от инактивации изучали, используя двухимпульсовый протокол (рис. 2) и оценивая соотношения амплитуд тестового и контрольного импульса (I_2/I_1); зависимость данного соотношения от интервала между импульсами выражали как моноэкспоненциальную зависимость:

$$I_2 / I_1 = 1 - a \times \exp(-t / \tau) \quad (3),$$

где τ — временная константа восстановления I_{Na} от инактивации.

При анализе конфигурации ПД оценивали максимальную скорость нарастания переднего фронта, а также длительность ПД на уровнях реполяризации 90%, 50% и 25%.

Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего для n клеток. Нормальность распределения выборок оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий оценивали с использованием t -теста Стьюдента для связанных или несвязанных выборок; для сравнения стационарных параметров тока использовали критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Деполяризация от поддерживаемого потенциала -120 мВ до -60 мВ и более вызывала в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах перепела активацию быстро активирующегося и инактивирующегося входящего тока (рис. 1, А, Б). Ток был чувствителен к тетродотоксину (10^{-6} М) и определен как I_{Na} [8]. Амплитуда I_{Na} и форма его вольт-амперной характеристики не различались между предсердными и желудочковыми клетками. Максимум пиковой амплитуды I_{Na} соответствовал деполяризации до -30 мВ, в желудочковых клетках он достигал $-54,55 \pm 2,32$ пА/пФ, в предсердных — $-56,61 \pm 2,58$ пА/пФ; значимых различий не было ($p = 0,563$; рис. 1, В). Сравнение с другими группами позвоночных показывает, что, видимо, для птиц характерна наибольшая плотность каналов I_{Na} в миокарде [8, 10]. Это согласуется с данными о высокой, по сравнению с таковой у других позвоночных, скорости нарастания переднего фронта ПД в миокарде птиц [6, 11, 12]. Быстрая временная константа инактивации τ для I_{Na} в предсердных миоцитах перепела была ниже, чем в желудочковых (рис. 1, Г), что характерно для

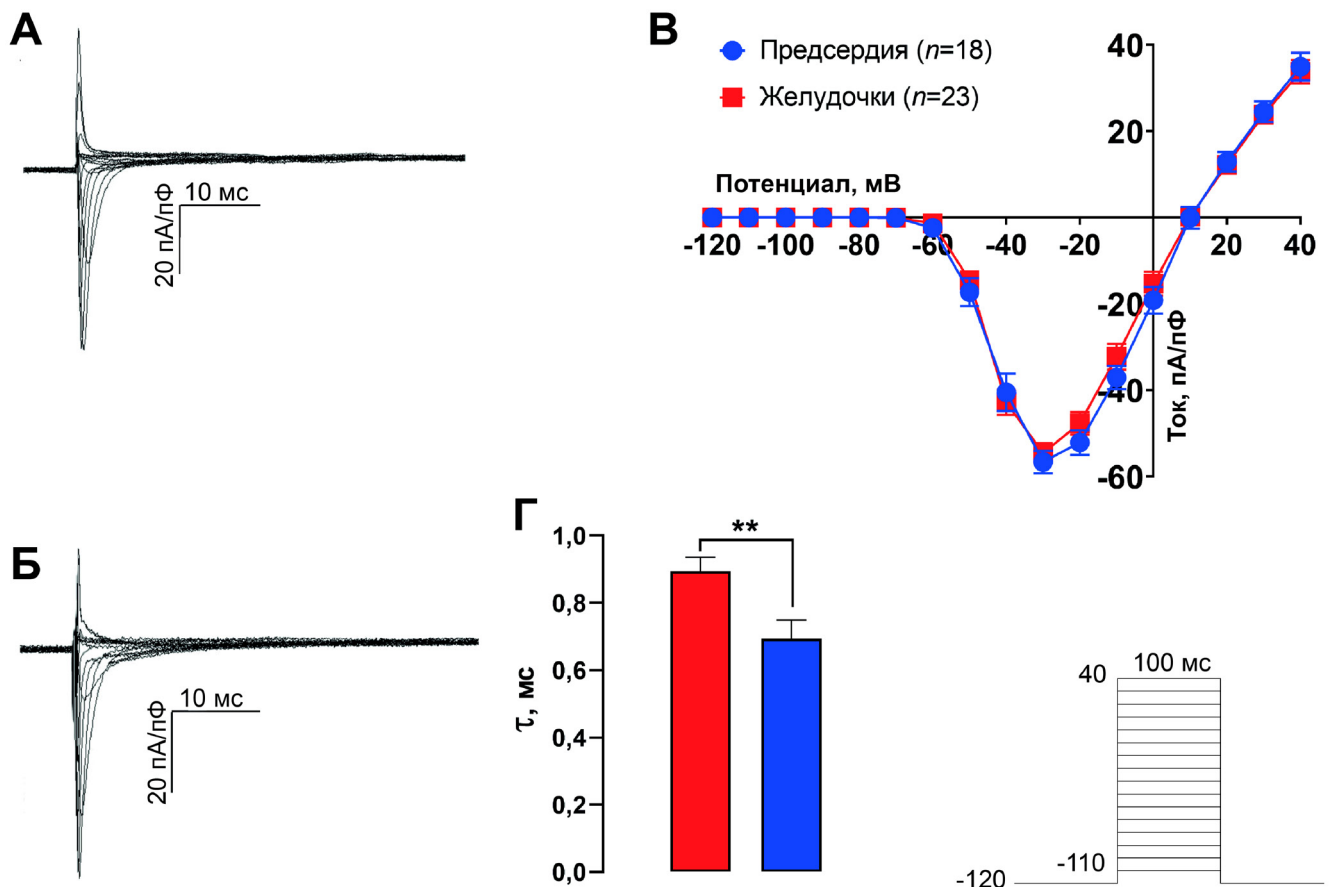


Рис. 1. Быстрый натриевый ток (I_{Na}) в изолированных кардиомиоцитах перепела. А, Б — репрезентативные записи I_{Na} в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах перепела соответственно. В — вольт-амперные характеристики I_{Na} в желудочковых ($n = 23$) и предсердных ($n = 18$) кардиомиоцитах перепела. Г — быстрая временная константа инактивации в желудочковых ($n = 23$) и предсердных ($n = 18$) кардиомиоцитах перепела при -30 мВ; ** — $p < 0,01$ (t -тест Стьюдента).

многих позвоночных [10]. По сравнению с другими позвоночными, включая человека, инактивация I_{Na} в миокарде перепела происходит заметно быстрее [10].

Стационарная активация в предсердных и желудочковых кардиомиоцитах различалась (рис. 2, А): в предсердиях V_{50} имел более положительное значение по сравнению с таковым в желудочковых клетках ($-35,59$ мВ и $-38,26$ мВ соответственно; $p < 0,0001$, тест Фишера). Кривые стационарной инактивации, полученные с использованием протокола с длительностью предимпульса 100 мс (см. рис. 2), что приблизительно соответствует длительности ПД в миокарде перепела [6], также различались ($p < 0,0001$, тест Фишера): в предсердных миоцитах кривая была сдвинута в сторону более отрицательных потенциалов ($V_{50} = -88,52$ мВ) по сравнению с таковым в желудочковых ($V_{50} = -84,76$ мВ). Таким образом, пересечение кривых стационарной активации и инактивации в желудочковых миоцитах находится при значении мембранного потенциала $-58,52$ мВ (соответствует 4,7% активных каналов), а в предсердных — при $-62,7$ мВ (соответствует 4% активных каналов). Сравнение с другими позвоночными (рыбы, амфибии, млекопитающие) не выявило резких различий в конфигурации кривых стационарной активации и инактивации [13–16]. Однако во всех этих работах был задействован протокол с длительностью предимпульса не менее 500 мс. В кардиомиоцитах перепела при увеличении длительности предимпульса до 1 с происходил сдвиг кривых стационарной инактивации в сторону более отрицательных потенциалов (рис. 2, А): в желудочковых кардиомиоцитах V_{50} сдвинулся до $-106,3$ мВ, в предсердных — до $-107,1$ мВ ($p < 0,0001$, тест Фишера). Пересечение кривых стационарной активации и инактивации также сдвигалось в сторону более отрицательных потенциалов, а площадь под графиками ниже их пересечения уменьшалась до пренебрежимо малых размеров. Поскольку площадь под пересечением кривых стационарной активации и инактивации

коррелирует с выраженностью «оконного» тока [17], можно предполагать, что при увеличении длительности прекодиционирующей деполаризации возможность реактивации натриевых каналов и возникновения «оконного» тока в кардиомиоцитах перепела значительно снижается. Аналогичный сдвиг кривой инактивации при изменении длительности предимпульса был показан в кардиомиоцитах человека [18] — однако в кардиомиоцитах перепела при аналогичном увеличении длительности предимпульса V_{50} стационарной инактивации оказывается более отрицательным. Таким образом, по сравнению с натриевыми каналами в миокарде других позвоночных, натриевые каналы в миокарде перепела обладают такими параметрами стационарной кинетики, которые снижают вероятность активации «оконного» натриевого тока, что может служить адаптацией к высокой частоте сокращения сердца птиц.

Между предсердными и желудочковыми миоцитами не было различий по временному ходу восстановления I_{Na} от инактивации ($p = 0,3331$, тест Фишера). Поскольку в данной работе не рассматривалось восстановление I_{Na} от инактивации при интервалах менее 50 мс, результирующая кривая была моноэкспоненциальной; временная константа данного процесса составила 62,76 мс (рис. 2, Б). Прямое сравнение данных с результатами аналогичных исследований затруднительно в силу различий в экспериментальных условиях. Сравнение только временной константы малоинформативно: так, в кардиомиоцитах рыб *Danio rerio* при использовании сходного протокола временная константа составляет менее 30 мс — однако при межимпульсном интервале 50 мс соотношение I_2/I_1 в кардиомиоцитах перепела оказывается значительно выше [16]. То есть каналы I_{Na} в миокарде перепела переходят из инактивированного состояния в закрытое быстрее, чем, по крайней мере, у некоторых видов холоднокровных животных, и способны обеспечивать более высокие значения частоты сокращений сердца. В аналогичных исследованиях для кардиомиоцитов мле-

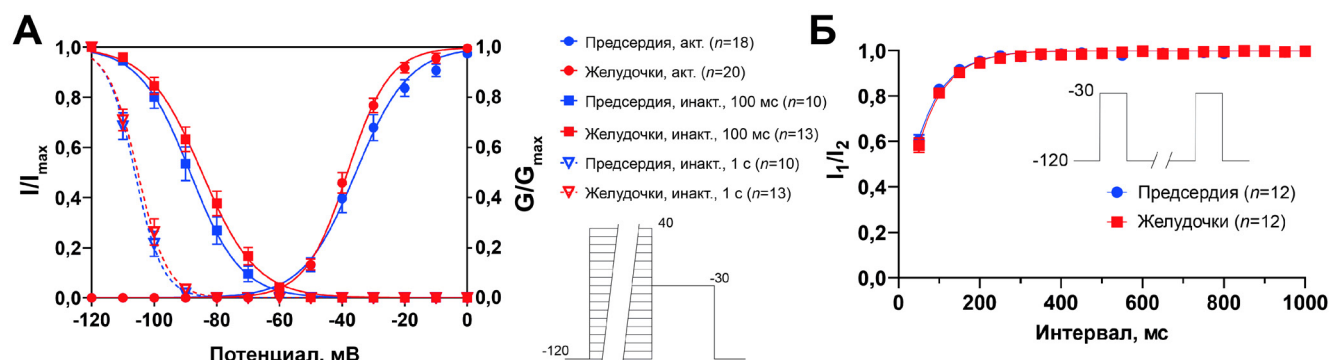


Рис. 2. Кинетические характеристики I_{Na} . А — кривые стационарной активации и инактивации в предсердных и желудочковых миоцитах перепела. Инактивационные кривые были построены с использованием разной длительности предимпульса (100 мс или 1 с). Б — восстановление I_{Na} от инактивации.

копитающих (человек, крыса), были показаны сходные значения соотношения I_2/I_1 и временной константы при одинаковых межимпульсных интервалах [14, 15, 19].

Поскольку ввиду большей длительности ПД (по сравнению с предсердным миокардом) электрическая активность желудочкового миокарда в большей степени благоприятствует проявлению позднего тока Na^+ [6, 20], мы изучили эффекты блокатора I_{NaL} ранолазина в желудочковых кардиомиоцитах перепела. Ранолазин в концентрации 10 мкМ вызывал сдвиг кривой стационарной инактивации в сторону более отрицательных потенциалов (рис. 3, А; $p < 0,0001$, тест Фишера) – то есть, как и в миокарде млекопитающих, ранолазин связывается с каналами I_{Na} в закрытом состоянии [21]. Ранолазин слабо влиял на инактивацию I_{Na} в желудочковых кардиомиоцитах (рис. 3, В, Г; $p = 0,055$ для τ_f , $p = 0,981$ для τ_s), однако подавлял пиковый I_{Na} , снижая его амплитуду на $13,26 \pm 2,90\%$ (рис. 3, Б). Предыдущие работы показали, что ранолазин оказывает более выраженное влияние на I_{Na} , в том числе на пиковый ток, в предсердном миокарде, что указывает на различия каналов I_{Na} в желудочковом и предсердном миокарде [22]. Однако в миокарде птиц структура α -субъединицы, а также набор и структура β -субъединиц практически не изучены и могут отличаться от таковых в миокарде млекопитающих. Ранолазин также изменял конфигурацию ПД в же-

лудочковых кардиомиоцитах перепела (рис. 3, Д): в концентрации 10 мкМ он вызывал снижение скорости нарастания переднего фронта ПД (рис. 3, Е), а также укорочение ПД на уровнях 90% и 50% реполяризации на $7,08 \pm 1,95\%$ и $6,11 \pm 1,42\%$ соответственно (рис. 3, Ж). Стоит отметить, однако, что поскольку ранолазин также подавляет калиевый ток задержанного выпрямления I_{Kr} , опосредующий реполяризацию миокарда перепела, то наблюдаемое в результате подавления I_{NaL} снижение длительности ПД было замаскировано замедлением реполяризации из-за подавления I_{Kr} [6, 23]. Поскольку восстановление I_{NaL} после инактивации происходит гораздо медленнее по сравнению с таковым для пикового I_{Na} , можно ожидать, что при физиологической частоте сокращений сердца перепела вклад I_{NaL} будет гораздо менее значительным [24]. Однако в ситуациях, когда частота сердечного ритма снижается, а длительность ПД увеличивается – как, например, в состоянии торпора – I_{NaL} может играть более значительную роль.

Таким образом, кинетические и стационарные характеристики I_{Na} в миокарде перепела предположительно отражают адаптацию электрической активности сердца птиц к высоким частотам сокращений, что необходимо для обеспечения высоких энергетических потребностей. При этом полученные данные указывают на определенные различия в функционировании быстрых натриевых каналов в сердце птиц и млекопитающих, проистекающие

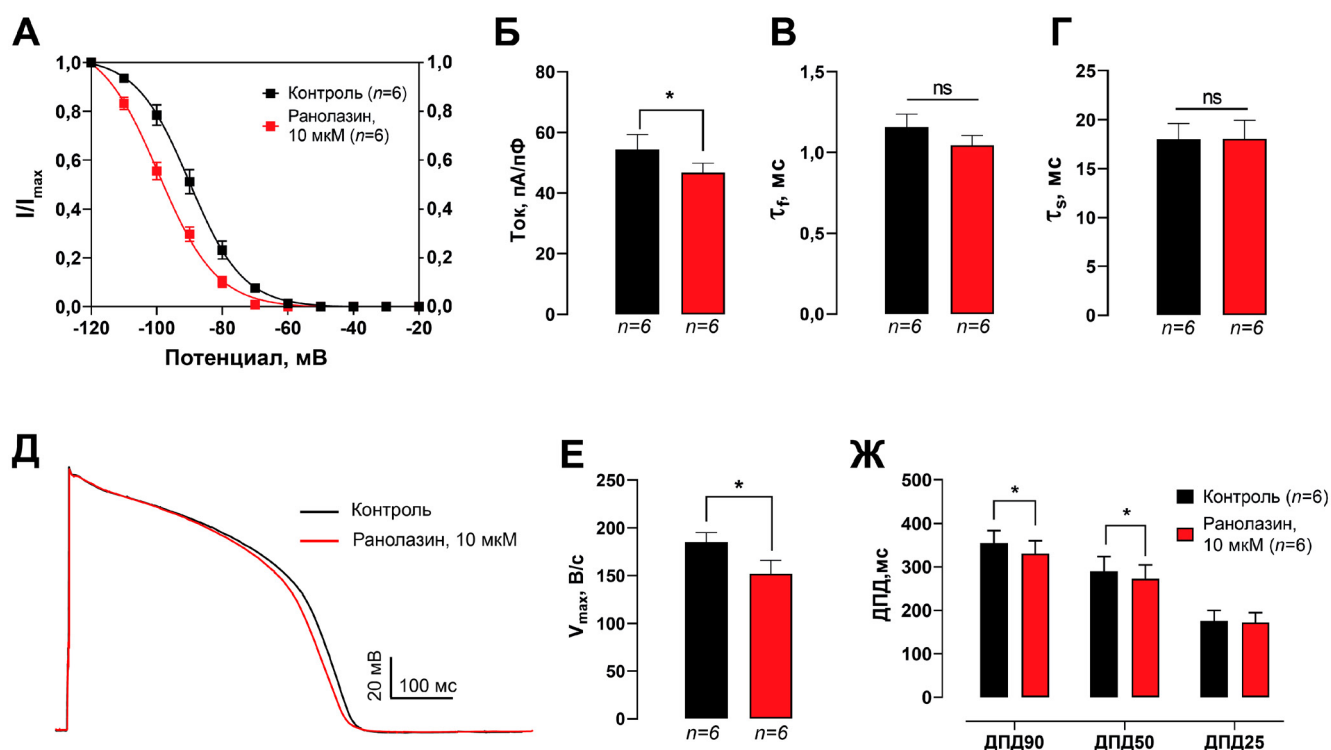


Рис. 3. Влияние ранолазина на конфигурацию I_{Na} и потенциалов действия в желудочковых кардиомиоцитах перепела. **А, Б, В, Г** – влияние ранолазина на стационарную инактивацию, пиковую амплитуду и временные константы (τ_f и τ_s) инактивации I_{Na} соответственно. **Д** – репрезентативные записи ПД в желудочковых миоцитах перепела в контроле и в присутствии 10 мкМ ранолазина. **Е, Ж** – влияние ранолазина на максимальную скорость нарастания переднего фронта и на длительность ПД в желудочковых миоцитах перепела; * – $p < 0,05$ (t -тест Стьюдента для связанных выборок).

из независимого, конвергентного приобретения эволюционных изменений и, вероятно, имеющие под собой в основе различия в структуре и наборе субъединиц натриевых каналов.

Работа выполнена в рамках государственного задания (проект № 122012100156-5) и научно-об-

разовательной школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amin A.S., Asghari-Roodsari A., Tan H.L. Cardiac sodium channelopathies // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2010. Vol. 460. N 2. P. 223–237.
2. Asfaw T.N., Bondarenko V.E. A mathematical model of the human cardiac Na⁺ channel // *J. Membr. Biol.* 2019. Vol. 252. N 1. P. 77–103.
3. Isom L.L., Jongh K.S. De, Patton D.E., Reber B.F.X., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A.L., Catterall W.A. Primary structure and functional expression of the $\beta 1$ subunit of the rat brain sodium channel // *Science*. 1992. Vol. 256. N 5058. P. 839–842.
4. Haufe V., Cordeiro J.M., Zimmer T., Wu Y.S., Schiccitano S., Benndorf K., Dumaine R. Contribution of neuronal sodium channels to the cardiac fast sodium current I_{Na} is greater in dog heart Purkinje fibers than in ventricles // *Cardiovasc. Res.* 2005. Vol. 65. N 1. P. 117–127.
5. Chadda K.R., Jeevaratnam K., Lei M., Huang C.L.H. Sodium channel biophysics, late sodium current and genetic arrhythmic syndromes // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2017. Vol. 469. N 5–6. P. 629–641.
6. Filatova T.S., Abramochkin D. V., Pavlova N.S., Pustovit K.B., Konovalova O.P., Kuzmin V.S., Dobrzynski H. Repolarizing potassium currents in working myocardium of Japanese quail: Novel translational model for cardiac electrophysiology // *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2021. Vol. 255: 110919.
7. Fujii S., Ayer R.K., DeHaan R.L. Development of the fast sodium current in early embryonic chick heart cells // *J. Membr. Biol.* 1988. Vol. 101. N 1. P. 209–223.
8. Vornanen M., Hassinen M., Haverinen J. Tetrodotoxin sensitivity of the vertebrate cardiac Na⁺ current // *Mar. Drugs*. 2011. Vol. 9. N 11. P. 2409–2422.
9. Jensen B., Wang T., Christoffels V.M., Moorman A.F.M. Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 2013. Vol. 1833. N 4. P. 783–794.
10. Abramochkin D. V., Filatova T.S., Pustovit K.B., Voronina Y.A., Kuzmin V.S., Vornanen M. Ionic currents underlying different patterns of electrical activity in working cardiac myocytes of mammals and non-mammalian vertebrates // *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2022. Vol. 268: 111204.
11. Hassinen M., Abramochkin D. V., Vornanen M. Seasonal acclimatization of the cardiac action potential in the Arctic navaga cod (*Eleginus navaga*, Gadidae) // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2014. Vol. 184. N 3. P. 319–327.
12. Islam M.A., Nojima H., Kimura I. Muscarinic M1 receptor activation reduces maximum upstroke velocity of action potential in mouse right atria. // *Eur. J. Pharmacol.* 1998. Vol. 346. N 2–3. P. 227–236.
13. Clark R.B., Giles W. Sodium current in single cells from bullfrog atrium: voltage dependence and ion transfer properties // *J. Physiol.* 1987. Vol. 391. N 1. P. 235–265.
14. Sakakibara Y., Wasserstrom J.A., Furukawa T., Jia H., Arentzen C.E., Hartz R.S., Singer D.H. Characterization of the sodium current in single human atrial myocytes // *Circ. Res.* 1992. Vol. 71. N 3. P. 535–546.
15. Sakakibara Y., Furukawa T., Singer D.H., Jia H., Backer C.L., Arentzen C.E., Wasserstrom J.A. Sodium current in isolated human ventricular myocytes // *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* 1993. Vol. 265. N 4. P. H1301–H1309.
16. Haverinen J., Hassinen M., Korajoki H., Vornanen M. Cardiac voltage-gated sodium channel expression and electrophysiological characterization of the sodium current in the zebrafish (*Danio rerio*) ventricle // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2018. Vol. 138. P. 59–68.
17. Zaza A., Rocchetti M. The late Na⁺ current – origin and pathophysiological relevance // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2013. Vol. 27. N 1. P. 61–68.
18. Schneider M., Proebstle T., Hombach V., Hannekum A., Rüdel R. Characterization of the sodium currents in isolated human cardiocytes // *Pflügers Arch.* 1994. Vol. 428. N 1. P. 84–90.
19. Shander G.S., Fan Z., Makielski J.C. Slowly recovering cardiac sodium current in rat ventricular myocytes: effects of conditioning duration and recovery potential // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 1995. Vol. 6. N 10. P. 786–795.
20. Burashnikov A. Late I_{Na} inhibition as an antiarrhythmic strategy // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2017. Vol. 70. N 3. P. 159–167.
21. Rajamani S., El-Bizri N., Shryock J.C., Makielski J.C., Belardinelli L. Use-dependent block of cardiac late Na⁺ current by ranolazine // *Hear. Rhythm.* 2009. Vol. 6. N 11. P. 1625–1631.
22. Zygmunt A.C., Nesterenko V. V., Rajamani S., Hu D., Barajas-Martinez H., Belardinelli L., Antzelevitch C. Mechanisms of atrial-selective block of Na⁺ channels by ranolazine: I. Experimental analysis of the use-dependent block // *Am. J. Physiol. – Hear. Circ. Physiol.* 2011. Vol. 301. N 4. P. 1606–1614.
23. Antzelevitch C., Belardinelli L., Zygmunt A.C., Burashnikov A., Di Diego J.M., Fish J.M., Cordeiro J.M., Thomas G. Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties // *Circulation*. 2004. Vol. 110. N 8. P. 904–910.
24. Carmeliet E. Action potential duration, rate of stimulation, and intracellular sodium // *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2006. Vol. 17. Suppl. 1. P. S2–S7.

Поступила в редакцию 04.05.2022

После доработки 13.07.2022

Принята в печать 27.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Characteristics of fast sodium current in isolated quail cardiomyocytes

T.S. Filatova^{1, *} , D.V. Abramochkin^{1, 2} 

¹ Department of Human and Animal Physiology, Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

² Laboratory of Cardiac Electrophysiology, National Medical Research Center for Cardiology,
15A-10 3rd Cherepkovskaya st., Moscow, 121552, Russia

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

Fast sodium current (I_{Na}) provides depolarization of working myocardium and defines the excitability of its cells and the velocity of excitation propagation in the tissue. Alterations in activation and inactivation of I_{Na} channels can lead to the onset of various arrhythmias. Cardiac I_{Na} is poorly studied in most vertebrate animals (excepting mammals) – including birds which are of great interest for comparative physiology. In the present work we for the first time study the characteristics of fast sodium current in myocardium of adult bird. Using standard patch clamp method, we recorded I_{Na} in isolated atrial and ventricular cardiomyocytes of Japanese quail. The current had great amplitude and quickly recovered from inactivation both in atrial and ventricular cells; the fast inactivation time constant of I_{Na} in atrial cells was lower than that of ventricular cells. Steady-state activation and inactivation suggest that sodium window current in avian myocardium is less pronounced in comparison to that in mammalian heart. In quail ventricular myocytes the blocker of late sodium current ranolazine caused a slight decrease in peak current amplitude and did not affect inactivation – however, it shifted steady-state inactivation curve towards more negative potentials, shortened action potentials and caused a decrease in maximum upstroke velocity. Thus, the characteristics of I_{Na} in quail myocardium reflect an adaptation to high heart rates in birds, and also suggest possible differences in the structure and function of I_{Na} channels between birds and mammals.

Keywords: *birds, myocardium, isolated cardiomyocytes, fast sodium current, patch clamp, ranolazine*

Funding: The research was supported by government funding (project number 122012100156-5) and by the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic biology”.

Сведения об авторах

Филатова Татьяна Сергеевна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; Тел. 8-929-515-25-78; e-mail: filatova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0131-1911>

Абрамочкин Денис Валерьевич – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; зав. лабораторией электрофизиологии сердца Национального медицинского исследовательского центра кардиологии. Тел. 8-916-603-05-02; e-mail: abram340@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5751-8853>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 581.1:551.468.3

Особенности распределения и состояния фитопланктона на разных глубинах в озере Кисло-Сладкое Белого моря**Д.Н. Маторин¹, * , Д.А. Тодоренко¹ , Д.А. Воронов⁴ , С.Н. Горячев¹ ,
Л.Б. Братковская² , Е.Д. Краснова³ **

¹Кафедра биофизики, ²кафедра общей экологии и гидробиологии и ³Беломорская биологическая станция имени Н.А. Перцова, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

⁴Институт проблем передачи информации имени А.А. Харкевича, Российская академия наук, Россия, 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д. 19, стр. 1

*e-mail: dnmatorin@mail.ru

Флуоресцентные методы были применены в исследовании фитопланктона стратифицированного озера Кисло-Сладкое на беломорском побережье в 2018 г. В хемоклине водоема (на границе аэробной и анаэробной зон) на глубине 3,3 м наблюдался красный слой воды с концентрацией хлорофилла а 1,7 мкг/л. В этом слое воды доминировали криптофитовые водоросли (*Rhodomonas* sp.), у которых зафиксирована высокая активность фотосинтетического аппарата по параметрам флуоресценции (PI_{ABS}), выраженная через высокие значения квантового выхода первичной фотохимической реакции в фотосистеме 2 (F_v/F_m), доли активных реакционных центров (РЦ) (RC/ABS) и квантового выхода электронного транспорта в фотосистеме 2 (Φ_{E0}). Высокая фотосинтетическая активность криптофитовых водорослей в зоне хемоклина может свидетельствовать об их устойчивости к присутствию сероводорода. В поверхностном слое воды у фитопланктона отмечалась более низкая фотосинтетическая активность. Опыты с фотоингибированием показали, что сообщество фитопланктона из хемоклина, несмотря на повышенную светочувствительность, характеризуется высокой репарационной способностью фотосинтетического аппарата после фотоокислительного стресса. Предлагается использование флуоресцентных методов для изучения состояния фитопланктона в прибрежных меромиктических водоемах.

Ключевые слова: Белое море, прибрежные меромиктические водоемы, фитопланктон, фотосинтез, фотоингибирование, флуоресценция хлорофилла

На побережье Белого моря обнаружено множество прибрежных меромиктических водоемов, в разной степени изолированных от моря [1, 2]. Они образовались в результате поднятия беломорского берега, которое происходит со скоростью около 0,3 см/год. В этих водоемах наблюдается четкая стратификация вод с поверхностным аэробным слоем, подверженным волновому и конвективному перемешиванию (миксолимнион), и нижним анаэробным слоем воды, на который перемешивание не распространяется (монимолимнион), между которыми формируется зона хемоклина (10–20 см) с резкими физико-химическими градиентами [1–5].

В зоне хемоклина обнаружены окрашенные слои вследствие массового развития ярко-красных или зеленых фототрофных микроорганизмов [4, 5]. В анаэробной части хемоклина (под редокс-переходом) развивается, как правило, высокоплотное сообщество аноксигенных фототрофных бактерий [6], а над редокс-границей в микроаэробной части хемоклина — узкая про-

слойка воды с цветением одноклеточных микроводорослей, устойчивых к присутствию небольшого количества сероводорода. В некоторых водоемах ярко-красный цвет воде в этой зоне придает массовое цветение криптофитовой водоросли *Rhodomonas* sp. [1], в других зеленый цвет — массовое развитие мелких зеленых жгутиковых водорослей, изредка *Euglena* sp. [5].

Флуоресценция хлорофилла благодаря своей неинвазивности и чувствительности, а также широкой доступности надежных приборов является удобным методом для мониторинга фотосинтетической активности фитопланктона [7–9]. Этот метод основан на том, что хлорофилл, находящийся в тилакоидных мембранах микроводорослей, способен к испусканию квантов флуоресценции [10–12]. На кафедре биофизики биологического факультета МГУ разработана и сертифицирована «Методика измерений обилия и индикации изменения состояния фитопланктона в природных водах флуоресцентным методом».

В современных работах наиболее часто используют два основных подхода для регистрации флуоресценции хлорофилла – метод быстрых индукционных кривых (ОИР-кривых) [10–12] и метод измерения световых кривых флуоресценции (РАМ-метод, т.е. pulse amplitude modulation fluorimetry) [13–16]. Индукционная кривая флуоресценции характеризует окислительно-восстановительные состояния первичного хинонного акцептора Q_A и последовательное восстановление переносчиков в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза от фотосистемы 2 (ФС2) до фотосистемы 1 (ФС1) [10]. В РАМ-методе возможно оценивать состояние фотосинтетического аппарата исследуемого объекта под световыми нагрузками и определять световые зависимости фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции [13]. Сочетание таких подходов позволяет более подробно изучать функциональное состояние фотосинтетического аппарата и работу отдельных участков ЭТЦ фотосинтеза у исследуемых организмов.

Целью настоящей работы было исследование распределения по глубине фитопланктона и его фотосинтетической активности в озере Кисло-Сладкое с использованием современных флуоресцентных методов.

Материалы и методы

Объектом исследования служил природный фитопланктон из прибрежного стратифицированного озера Кисло-Сладкое (66° 32.87' N, 33° 08.14' E) в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ. Исследования проводили в начале сентября в 2018 г. Отбор проб воды осуществляли по-

гружным насосом Whale Premium Submersible Pump GP1352 (Whale, США).

Регистрацию физико-химических параметров воды проводили в момент отбора проб. Температуру и соленость определяли с помощью кондуктометра WTW Cond 3110 (WTW, Германия). Содержание растворенного кислорода регистрировали диффузионным оксиметром «MARK 302 E» (ООО «Взор», Россия) с погружным зондом, pH и окислительно-восстановительный потенциал (Eh) измеряли прибором WaterLiner WMM-73 (Metronx, Тайвань), освещенность – люксметром AR813A (Smart Sensor, Китай), модифицированным для погружения под воду.

Быстрые индукционные кривые флуоресценции (ОИР-кривые) регистрировали с помощью флуориметра Aquapen–C 100 (Photon System Instruments, Чехия) при возбуждении светом с длиной волны 455 нм и интенсивностью 3000 мкмоль фотонов·м⁻²·с⁻¹ в течение 2 с. Интенсивности флуоресценции при 50 мкс (F_O), 100 мкс, 300 мкс, 2 мс (F_J), 30 мс (F_I) и максимальный уровень флуоресценции (F_M = F_P) использовались при расчете параметров флуоресценции из индукционных кривых с помощью JIP-теста в соответствии с описанным ранее методом [10] (таблица). Фотосинтетическую активность фитопланктона определяли по пара-метру максимального квантового выхода первичной фотохимической реакции в ФС2 как F_V/F_M = (F_M – F_O)/F_M = φ_{Po}. Для оценки эффективности электронного транспорта использовали параметр φ_{Eo} = φ_{Po} × ψ_{Eo}, где ψ_{Eo} = 1 – (F_J – F_O)/(F_M – F_O) – вероятность транспорта электронов за пределы Q_A⁻. Долю активных реакционных центров (РЦ)

Таблица

Физико-химические параметры воды и параметры флуоресценции фитопланктона поверхностного слоя воды и из хемоклина озера Кисло-Сладкое. Указаны средние значения и стандартные отклонения, * – значимые различия (p < 0,05)

Параметры	Поверхностный слой воды	Слой воды из зоны хемоклина (3,3 м)
Физико-химические параметры воды		
Соленость, ‰	21,8	23,7
Температура, °C	16	13,7
pH	8,26	7,31
Eh, мВ	242	–125
O ₂ растворенный (мг/л, с учетом поправки)	116	1,4
Подводная освещенность, в % от освещенности на поверхности (0 м)	100	5
Флуоресцентные параметры фитопланктона		
F _O	349	1512
F _V /F _M	0,45 ± 0,05	0,63 ± 0,01*
φ _{Eo}	0,17 ± 0,01	0,37 ± 0,05*
RC/ABS	0,13 ± 0,01	0,44 ± 0,02*
PI _{ABS}	0,16 ± 0,01	1,22 ± 0,03*
ETR, отн.ед (при 50 мкмоль фотонов м ⁻² ·с ⁻¹)	3,10 ± 0,03	5,60 ± 0,05*
α	0,09 ± 0,001	0,11 ± 0,002*
E _n , мкмоль фотонов м ⁻² ·с ⁻¹	209 ± 12	157 ± 15*
NPQ (при 50 мкмоль фотонов м ⁻² ·с ⁻¹)	0,05 ± 0,06	0,32 ± 0,02*

оценивали по параметру $RC/ABS = 1/(4 \times (F_{300\mu s} - F_0) \times (F_M - F_0)^{-1} \times (F_J - F_0)^{-1} \times F_M)$. Индекс производительности $PI_{ABS} = RC/ABS \times F_V/F_M \times (1 - F_V/F_M)^{-1} \times \psi_{Eo} \times (1 - \psi_{Eo})^{-1}$ использовали для оценки жизнеспособности клеток фитопланктона.

Быстрые световые кривые флуоресценции фитопланктона регистрировали на импульсном флуориметре Water-PAM (Walz, Германия), в котором в качестве источника измеряющего, актиничного и насыщающего света используется синий свет от светодиода (450 нм). Быстрые световые кривые фотохимического тушения ($Yield = (F_M' - F_t)/F_M'$), нефотохимического тушения ($NPQ = F_M/F_M' - 1$) и скорости нециклического электронного транспорта ($ETR = Yield \times \text{интенсивность света} \times 0,5$) получены при последовательном увеличении интенсивности актиничного света ($0-800 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), время световых сеансов составило 30 с. Из световой кривой ETR рассчитывали следующие параметры: коэффициент максимальной утилизации световой энергии (угол наклона световой кривой — α) и насыщающую интенсивность света ($E_n = ETR_{\text{макс}}/\alpha$). Обозначения и описание фотосинтетических параметров представлены в соответствии с общепринятой номенклатурой [13].

Обилие фитопланктона оценивали по величине интенсивности начальной флуоресценции — F_0 , которая пропорциональна суммарному светособирающему комплексу (ССК) фитопланктона, содержащегося в единице объема воды [17]. Калибровка флуориметра в единицах концентрации хлорофилла a была проведена с помощью морских культур с разной плотностью.

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакеты программ OriginPro 2018 и Grapher 11. Измерения проводили в трех повторностях для каждого показателя. Средние значения и стандартные отклонения были рассчитаны для каждого показателя.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены основные физико-химические параметры воды и флуоресценции фитопланктона озера Кисло-Сладкое. В поверхностном слое воды соленость составила 21,8‰, что близко к солености Белого моря [1].

Вертикальное распределение параметров флуоресценции фитопланктона (F_0 и F_V/F_M) по глубине в озере Кисло-Сладкое в сентябре 2018 г. представлено на рис. 1. Содержание хлорофилла a , рассчитанное по F_0 , в поверхностном слое воды 0–20 см составляло 0,3 мкг/л и было близко к значениям этого параметра для открытой части Белого моря. С глубиной отмечалось увеличение значений F_0 , которые достигали максимальных значений в красном слое на глубине 3,3 м, где содержание хлорофилла a , пересчитанное из сигнала F_0 , достигало 1,7 мкг/л.

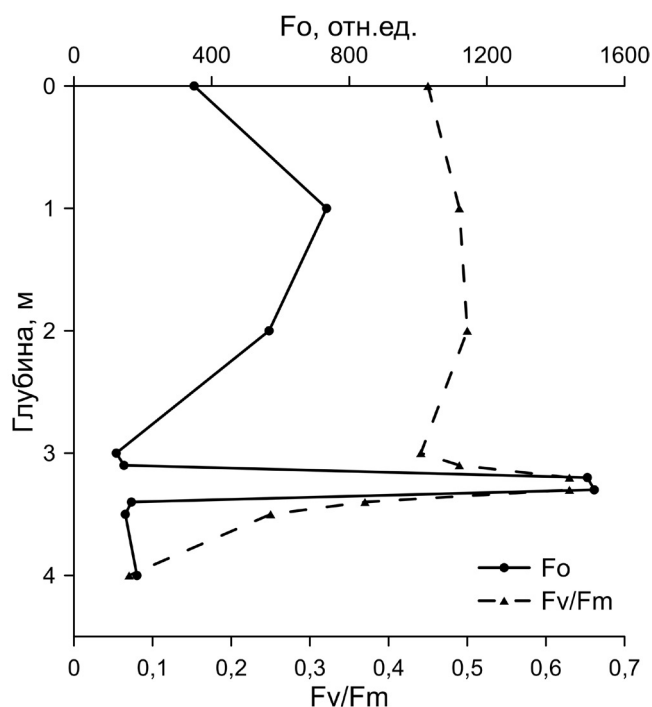


Рис. 1. Вертикальное распределение параметров флуоресценции F_0 (обилие) и F_V/F_M (фотосинтетическая активность) фитопланктона в озере Кисло-Сладкое.

Параметр F_V/F_M рассматривается как показатель максимальной квантовой эффективности процессов ФС2, связанной с разложением воды и выделением кислорода [7–9]. В поверхностном слое 0–20 см величина параметра F_V/F_M составила 0,45. У большинства культур микроводорослей максимальное значение F_V/F_M составляет около 0,65–0,70, но может быть и ниже, если клетки испытывают недостаток питательных веществ или другой стресс [7]. В лагуне на озере Кисло-Сладкое на глубине 3,3 м, где подводная освещенность была низкой и окислительно-восстановительный потенциал отрицательным (–125 мВ) с полным отсутствием растворенного кислорода (0 мг/л), фотосинтетическая активность фитопланктона была высокой со значением $F_V/F_M = 0,63$ (таблица). Такие значения F_V/F_M характерны для лабораторных культур микроводорослей, находящихся в благоприятных условиях культивирования [7].

С помощью светового микроскопа обнаружено, что красный цвет воде придают криптофитовые водоросли, относящиеся к роду *Rhodomonas*. Проведенное нами ранее точное определение рода и вида с помощью метода секвенирования гена ядерной рРНК показало максимальное сходство с *Rhodomonas abbreviata* (U53128.1) [3]. Вклад *Rhodomonas* sp. в численность и биомассу составил 80% в слое 3,3 м. В поверхностных слоях были представлены диатомовые водоросли.

Ранее клетки криптофитовых микроводорослей в большом числе были найдены и в других беломорских меромиктических водоемах [5]. В сен-

тябре 2018 г. от поверхности до глубины 2,5 м в фитопланктоне доминировали автотрофные динофитовые водоросли *Gymnodinium* sp. и мелкие кокки с флуоресценцией, характерной для хлорофилла а. На глубине 3–3,1 м в большом количестве присутствовали хищные динофлагелляты *Oxyrrhis marina* Dujardin, 1841 и небольшое количество *Rhodomonas* sp., численность которых ограничивал этот хищник. На глубине 3,2–3,3 м выявлено цветение *Rhodomonas* sp. с численностью 89–197 млн. кл./л и биомассой до 26 мгС/л.

Область наибольшей концентрации *Rhodomonas* sp. всегда приурочена к хемоклину и располагается непосредственно над границей сероводородного слоя. В период исследований в зоне обитания этих жгутиконосцев на глубине 3,3 м сероводород присутствовал в концентрации 2,4 мг/л. Ниже зоны обитания криптофитовых водорослей его концентрация возрастала до 2,7–4,1 мг/л. *Rhodomonas* sp. имеют пигмент фикоэритрин, который позволяет им осуществлять фотосинтез на глубине, куда доходит главным образом зеленая часть солнечного спектра. Кроме того, они миксотрофы и наряду с фотосинтезом способны усваивать органические вещества из воды и поедать бактерий. В свою очередь, эти жгутиконосцы могут служить пищей более крупным организмам – инфузориям, коловраткам, ракообразным.

Нами были изучены особенности функционирования фотосинтетического аппарата фитопланктона на разных глубинах по параметрам индукционных и световых кривых флуоресценции (таблица). Параметр Φ_{E0} отражает квантовый выход электронного транспорта в ФС2. Значение Φ_{E0} у поверхностного фитопланктона было невысоким (0,17) по сравнению с фитопланктоном, обитающим на глубине 3,3 м. У фитопланктона,

обитающего на глубине, обнаружена высокая эффективность электронного транспорта со значением $\Phi_{E0} = 0,37$.

Доля активных РЦ ФС2, определенная по параметру RC/ABS, у поверхностного фитопланктона была низкой. На глубине 3,3 м она достигала максимального значения. Параметр PI_{ABS} , характеризующий функциональную активность ФС2, также был высоким для фитопланктона, обитающего на глубине 3,3 м. Значения параметра PI_{ABS} для поверхностного фитопланктона были низкими.

Для исследования реакции фитопланктона из поверхностного слоя воды и из зоны хемоклина 3,3 м на возрастающую световую нагрузку регистрировали световые кривые флуоресценции. Из параметров флуоресценции при разных интенсивностях света можно рассчитать относительную скорость нециклического электронного транспорта (ETR) [9, 14, 15, 18]. На рис. 2 представлены световые кривые ETR фитопланктона озера Кисло-Сладкое. Как видно из рис. 2, кривая зависимости ETR от интенсивности освещения имеет классическую форму кривой «фотосинтез-освещенность» с линейным светолимитированным участком и участком, где кривая выходит на плато, на котором дальнейшее увеличение интенсивности света не влияет на скорость фотосинтеза и может даже приводить к его уменьшению. Кривые ETR фитопланктона из поверхностного слоя и из зоны хемоклина (3,3 м) различались. Фитопланктон в зоне хемоклина находится в затененных условиях, о чем свидетельствуют измерения подводной освещенности, в связи с чем характеризуется более быстрым насыщением ЭТЦ при низких интенсивностях света.

При высокой освещенности наблюдается уменьшение фотосинтетической активности, т.е.

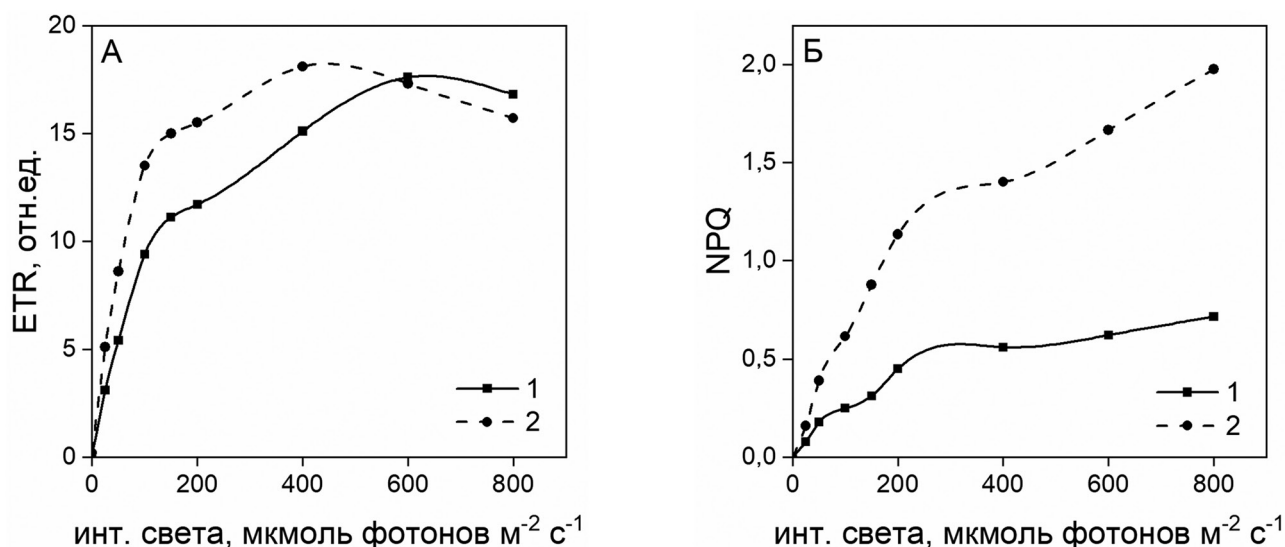


Рис. 2. Световые кривые зависимости относительной скорости нециклического электронного транспорта (ETR) (А) и нефотохимического тушения (NPQ) флуоресценции (Б) фитопланктона из озера Кисло-Сладкое от интенсивности света (инт. света). Фитопланктон поверхностных вод (1) и из зоны хемоклина (2).

фотоингибирование. Следует отметить, что у фитопланктона из зоны хемоклина фотоингибирование ETR происходило при более низкой интенсивности света по сравнению с таковым для поверхностного фитопланктона.

Из световых кривых ETR был рассчитан коэффициент максимальной утилизации световой энергии (α) (таблица). По сравнению с поверхностным слоем у фитопланктона из зоны хемоклина отмечалось увеличение этих показателей, что согласуется с изменениями в ЭТЦ, зарегистрированными по параметру Φ_{E0} , рассчитанному из индукционных кривых флуоресценции.

Используемая нами методика позволяет также оценить нефотохимическое тушение флуоресценции (non-photochemical quenching — NPQ), связанное с относительным увеличением диссипации избыточной энергии [13]. Параметр NPQ связан с ксантофилловым циклом, выполняющим функцию защиты фотосинтетического аппарата от избытка энергии при повышенной инсоляции, в результате чего происходит рассеивание энергии поглощенных фотонов в тепло [19]. Как видно из рис. 2, фитопланктон на глубине 3,3 м характеризовался наибольшими значениями NPQ по сравнению с поверхностным фитопланктоном. При низкой интенсивности света 50 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ значение NPQ для *Rhodomonas* с 3,3 м составило 0,32. При увеличении интенсивности света происходило значительное увеличение нефотохимических потерь в антенне ФС2 у *Rhodomonas* за счет более быстрого восстановления переносчиков в ЭТЦ. У поверхностного фитопланктона зарегистрированы более низкие значения NPQ , которые свидетельствуют о его устойчивости к избыточной световой энергии.

Известно, что при действии повышенной интенсивности света может развиваться фотоингибирование фотосинтеза, связанное с включением защитных процессов диссипации избыточной световой энергии в тепло [19, 20] и с распадом D_1 -белка ФС2. Концентрация активных центров ФС2 в клетках зависит от соотношения скоростей ее фотоокислительной деструкции и репарации, которые могут быть определены по снижению величины F_V/F_M на интенсивном свете и ее последующему восстановлению в темноте [19, 20]. На рис. 3 представлены изменения фотосинтетической активности (F_V/F_M) клеток фитопланктона в поверхностном слое воды и из зоны хемоклина при двух режимах световой нагрузки. У фитопланктона из зоны хемоклина наблюдалось более существенное снижение F_V/F_M при действии света высокой интенсивности по сравнению с поверхностным фитопланктоном. Эти данные подтверждают большую светочувствительность у криптофитовых водорослей, чем у поверхностного фитопланктона.

Восстановление фотосинтетической активности фитопланктона после фотоингибирования имеет две фазы. Быстрое восстановление активности в течение 30 мин обусловлено регуляторными механизмами, а медленное восстановление в течение нескольких часов связано с процессами реинтеграции белков реакционного центра ФС2 [19]. Как видно из рис. 3, после облучения светом с интенсивностью 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ F_V/F_M активность обоих образцов восстанавливалась через 2 ч в темноте. В то же время, после воздействия интенсивного освещения 2000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ у поверхностного фитопланктона обнаружены необратимые нарушения, проявляю-

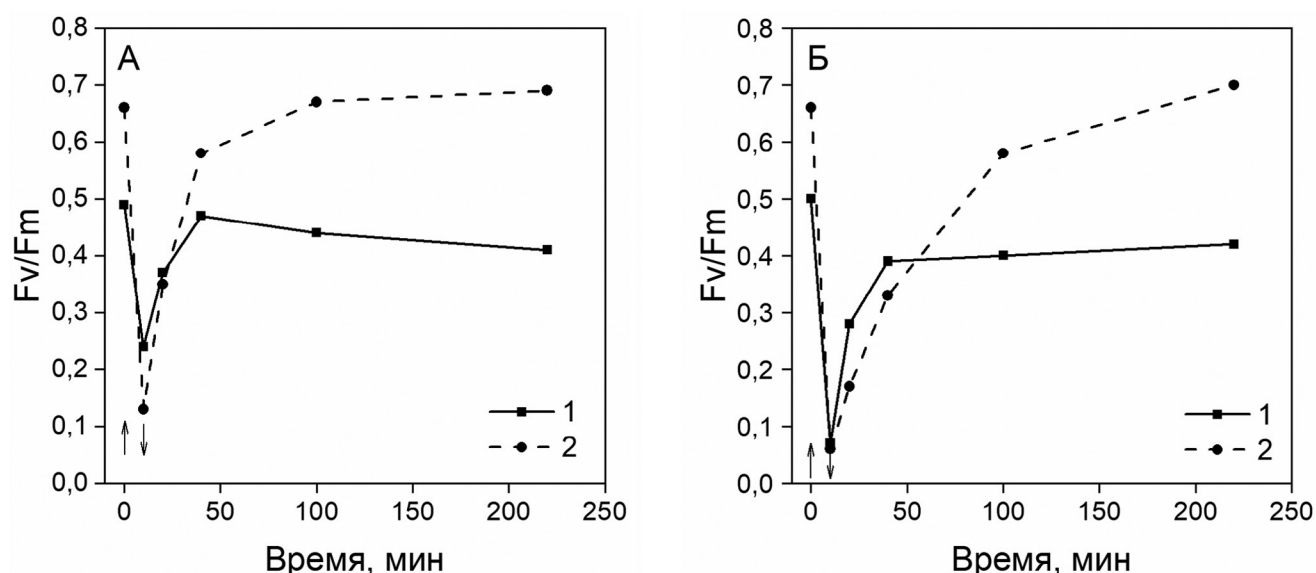


Рис. 3. Изменение параметра F_V/F_M фитопланктона поверхностных вод (1) и из зоны хемоклина (2) озера Кисло-Сладкое при повышенной освещенности и последующей темновой экспозиции клеток при двух режимах световой нагрузки — 600 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (А) и 2000 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ (Б) в течение 10 мин. 1 — поверхностный фитопланктон, 2 — фитопланктон из зоны хемоклина (3,3 м). Стрелками вверх и вниз показаны моменты включения и выключения света соответственно.

щиеся в неполном восстановлении его фотосинтетической активности в темноте. Фитопланктонное сообщество с доминированием криптофитовых водорослей из зоны хемоклина на глубине 3,3 м было способно к полной репарации $\Phi C2$ (F_V/F_M) даже после интенсивного освещения.

Таким образом, в озере Кисло-Сладкое в 2018 г. наблюдался красный слой с наибольшей концентрацией фитопланктона, приуроченный к верхней границе хемоклина (3,3 м). В этом слое доминировали криптофитовые водоросли (*Rhodomonas* sp.), для которых зафиксирована высокая функциональная активность $\Phi C2$ (PI_{ABS}), выраженная через высокие значения квантового выхода фотохимии $\Phi C2$ (F_V/F_M), доли активных РЦ (ABS/RC) и квантовый выход электронного транспорта в $\Phi C2$ (Φ_{E0}). Такая высокая функциональная активность фотосинтетического аппарата при наличии сероводорода может свидетельствовать об устойчивости криптофитовых водорослей к его присутствию в зоне хемоклина. В поверхностном слое воды у фитопланктона отмечали более низкие показатели фотосинтетической активности. Фитопланктонное сообщество хемоклина было более восприимчиво к световым нагрузкам. При увеличении интенсивности освещения у этого фитопланктона происходило более быстрое насыщение ЭТЦ фотосинтеза и увеличение нарастания нефотохимического тушения в антенне $\Phi C2$ по сравнению с поверхностным фитопланктоном. Однако, несмотря на повышенную светочувствительность, фитопланктон из зоны хемоклина ха-

рактеризовался большей репарационной способностью фотосинтетической активности после фотоокислительного стресса.

Высокие показатели фотосинтетической активности сообщества криптофитовых микроводорослей на верхней границе хемоклина указывают на благоприятные условия их существования. Эти условия определяются подходящими термохалинными условиями, световым режимом и поступлением питательных веществ из нижележащей анаэробной зоны. Возможно, что криптофитовые микроводоросли используют для питания бактерии в сероводородном слое. Известна способность некоторых видов криптофитовых водорослей к фагоцитозу бактериальных клеток [7]. Это указывает на роль красного криптофитового слоя как возможного связующего звена между сообществом серобактерий и сообществом оксифильных организмов металимниона, пространственно разобщенными ввиду стратификации и меромиксиса.

Работа выполнена при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды», Российского научного фонда (проект № 20-64-46018) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-00465).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krasnova E.D., Pantyulin A.N., Belevich T.A., Voronov D.A., Demidenko N.A., Zhitina L.S., Ilyash L.V., Kokryatskaya N.M., Lunina O.N., Mardashova M.V., Prudkovsky A. A., Savvichev A.S., Filippov A.S., Shevchenko V.P. Multidisciplinary studies of the separating lakes at different stage of isolation from the White Sea performed in march 2012 // *Oceanology*. 2013. Vol. 53. N 5. P. 714–717.
2. Krasnova E.D. Ecology of meromictic lakes of Russia. 1. Coastal marine waterbodies // *Water Resources*. 2021. Vol. 48. N 3. P. 427–438.
3. Krasnova E.D., Pantyulin A.N., Matorin D.N., Todorenko D.A., Belevich T.A., Milyutina I.A., Voronov D.A. Blooming of the Cryptomonad alga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyta, Pyrenomonadaceae) in the redox zone of the basins separating from the White Sea // *Microbiology*. 2014. Vol. 83. N 3. P. 270–277.
4. Krasnova E., Voronov D., Frolova N., Pantyulin A., Samsonov T. Salt lakes separated from the White Sea // *EARSeL eProceedings*. 2015. Vol. 14. P. 8–22.
5. Krasnova E., Matorin D., Belevich T., Efimova L., Kharcheva A., Kokryatskaya N., Losyuk G., Todorenko D., Voronov D., Patsaeva S. The characteristic pattern of multiple colored layers in coastal stratified lakes in the process of separation from the White Sea // *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2018. N 6. P. 1–16.
6. Lunina O.N., Savvichev A.S., Kuznetsov B.B., Pimenov N.V., Gorlenko V.M. Anoxicogenic phototrophic bacteria of the Kiso-Sladkoe stratified lake (White Sea, Kandalaksha Bay) // *Microbiology*. 2013. Vol. 82. N 6. P. 815–832.
7. Falkowski P.G., Raven J.A. Aquatic photosynthesis. USA: Princeton University Press, 2007. 488 pp.
8. Suggett D.J., Prášil O., Borowitzka M.A. Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. Dordrecht: Springer, 2010. 326 pp.
9. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей. Ижевск-Москва: Ижевский институт компьютерных исследований, 2012. 256 с.
10. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient // Chlorophyll a fluorescence. Advances in photosynthesis and respiration, vol. 19 / Eds. C. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 321–362.
11. Lazár D., Schansker G. Models of chlorophyll a fluorescence transients // Photosynthesis in silico / Eds. A. Laisk, L. Nedbal, and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2009. P. 85–123.
12. Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R. J., Kalaji V., Bosa K., Allakhverdiev S., Elsheery N.I. Frequently asked

questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues // *Photosynth. Res.* 2014. Vol. 122. N 2. P. 121–158.

14. Schreiber U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview // *Chlorophyll a fluorescence. advances in photosynthesis and respiration* / Eds. G.C. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2004. P. 279–319.

15. Serôdio J., Vieira S., Cruz S., Barroso F. Short-term variability in the photosynthetic activity of micro-phytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence // *Mar. Biol.* 2005. Vol. 146. P. 903–914.

16. Ralph P.J., Gademann R. Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity // *Aquat Bot.* 2005. Vol. 82. N 3. P. 222–237.

17. Matorin D., Antal T., Ostrowska M., Rubin A., Ficek D., Majchrowski R. Chlorophyll fluorimetry as a method for studying light absorption by photosynthetic pigments in marine algae // *Oceanologia.* 2004. Vol. 46. N 4. P. 519–531.

18. Mosharov S.A., Sergeeva V.M., Sazhin A.F., Kremenetskiy V.V., Stepanova S.V. Assessment of phytoplankton photosynthetic efficiency based on measurement of fluorescence parameters and radiocarbon uptake in the Kara Sea // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2019. Vol. 218. P. 59–69.

19. Chow W.S., Aro E.-M. Photoinactivation and mechanisms of recovery // *Photosystem II. Advances in photosynthesis and respiration* / Eds. T.J. Wydrzynski, K. Satoh, and J.A. Freeman. Dordrecht: Springer. 2005. P. 627–648.

20. Vavilin D.V., Polynov V.A., Matorin D.N., Venediktov P.S. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa* // *J. Plant Physiol.* 1995. Vol. 146. N 5–6. P. 609–614.

Поступила в редакцию 26.05.2022

После доработки 16.07.2022

Принята в печать 27.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Features of the distribution and condition of phytoplankton at different depths in the Kislo-Sladkoe Lake partly isolated from the White Sea

D.N. Matorin^{1,*} , D.A. Todorenko¹ , D.A. Voronov⁴ , S.N. Goryachev¹ ,
L.B. Bratkovskaya² , E.D. Krasnova³ 

¹Department of Biophysics, ²Department of General Ecology and Hydrobiology, and ³N.A. Pertsov White Sea Biological Station, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

⁴A.A. Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051, Moscow, 19–1 Bol'shoy Karetnyy pereulok

*e-mail: dnmatorin@mail.ru

Chlorophyll fluorescence methods were used for study of phytoplankton in the Kislo-Sladkoe Lake on the White Sea coast in 2018. In the chemocline (between aerobic and anaerobic zones) of the lake at a depth of 3.3 m a red water layer was observed with chlorophyll *a* concentration of 1.7 µg/L, despite the presence of hydrogen sulfide. This water layer was dominated by cryptophyte algae (*Rhodomonas* sp.), in which a high functional activity of the photosynthetic apparatus was observed in terms of the PI_{ABS} fluorescence parameter, expressed through high values of the quantum yield of the primary photochemical reaction in PS2 (F_V/F_M), the proportion of active RCs (RC/ABS), and the quantum yield of electron transport in PS2 (ϕ_{E0}). Such a high functional activity of the photosynthetic apparatus of cryptophyte algae in the chemocline may indicate the resistance of cryptophyte algae to the presence of hydrogen sulfide. By comparison, the phytoplankton in the surface water layer showed lower photosynthetic activity. Experiments with photoinhibition showed that the chemocline phytoplankton community is characterized by a greater reparative capacity after photooxidative stress despite the increased photosensitivity. Application of chlorophyll fluorescence methods for study of the state of phytoplankton in stratified meromictic water bodies is proposed.

Keywords: White Sea, coastal meromictic water bodies, phytoplankton, photosynthesis, photoinhibition, chlorophyll fluorescence

Funding: The research was carried with the support of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University. M.V. Lomonosov “The Future of the Planet and Global Environmental Changes”, the Russian Science Foundation (project number 20-64-46018) and the Russian Foundation for Basic Research (project number 20-04-00465).

Сведения об авторах

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

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

Воронов Дмитрий Анатольевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН. Тел.: 8-495-939-09-43; e-mail: da_voronov@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7870-3393>

Горячев Сергей Николаевич — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-15; e-mail: goryachev156@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4004-4270>

Братковская Любовь Борисовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры общей экологии и гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-18; e-mail: profkom-bio@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0511-7983>

Краснова Елена Дмитриевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-33; e-mail: e_d_krasnova@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3962-5564>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.222.6

Витамин K₂ является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd*-типа у *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529**Т.Ю. Динариева^{1,*,§}, А.И. Климко^{1,§}, Т.А. Чердынцева¹,
А.Л. Брюханов¹, А.И. Нетрусов^{1,2}**¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, 101000, Россия, г. Москва, ул. Мясницкая, д. 20

*e-mail: dinarieva@mail.ru

§ равноценный вклад

Lacticaseibacillus rhamnosus КМ МГУ 529 выращивали в периодической культуре при интенсивной аэрации в присутствии 38 мкМ гемина и 18 мкМ витамина K₂ как источника менахинона для активации дыхательного метаболизма. Контролем служила аэробная культура, выращенная без добавления гемина и менахинона. Внесение в ростовую среду гемина или менахинона по отдельности не оказывало существенного влияния на рост культуры. В дыхательных условиях (гемин + K₂) выход биомассы суточной культуры составлял $2,86 \pm 0,05$ г сухих клеток/л, а молярный экономический коэффициент $Y_{P/S}$ после 18 ч культивирования – $25,6 \pm 1,5$ г сухих клеток/моль использованной глюкозы. Оба значения превышали аналогичные показатели для аэробных условий на 27%. Спектральный анализ выявил присутствие цитохромов *b*- и *d*-типа в мембранах *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Активность электрон-транспортной цепи бактерии исследовали полярографическим методом. Препараты мембран из клеток, выращенных аэробно на среде с гемином, активно потребляли кислород в присутствии 1 мМ НАДН. Внесение 0,2 мМ менахинона в реакционную смесь сопровождалось увеличением скорости окисления мембранами НАДН в 4,6 раза. С помощью MALDI-TOF MS/MS идентифицированы ферменты, предположительно участвующие в окислении мембранами НАДН: пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза (Noh-2), НАДН-дегидрогеназа 2 (Ndh-2) и субъединица I убинолоксидазы *bd* (CydA). Таким образом, при окислении НАДН 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду шло через Ndh-2, менахинон, хинолоксидазу *bd*-типа и только 20% – через Noh-2. В работе приведены экспериментальные свидетельства в пользу функционирования электрон-транспортной цепи у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при аэробном культивировании в присутствии гемина и менахинона. Впервые измерены скорости окисления НАДН препаратами мембран молочнокислой бактерии. При этом впервые продемонстрировано *in vitro* свойство экзогенного менахинона переносить электроны от Ndh-2 к хинолоксидазе *bd*-типа у молочнокислой бактерии.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, дыхание, электрон-транспортная цепь, НАДН-дегидрогеназа 2, хинолоксидаза *bd*, Noh-2

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют в качестве стартовых и пробиотических культур при производстве ферментированных продуктов. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении с пищей в достаточных количествах приносят пользу здоровью организма хозяина [1]. Среди лактобацилл, отнесенных к пробиотикам, широко изучается *Lacticaseibacillus rhamnosus*, ранее известная как *Lactobacillus rhamnosus*. В настоящее время из всех известных штаммов *L. rhamnosus* только штамм GG наиболее изучен и официально признан безо-

пасным [2]. Поиск новых безопасных штаммов МКБ с выраженными пробиотическими свойствами и высокой устойчивостью к условиям технологических процессов является весьма актуальным.

По современным представлениям наиболее технологичными способами получения стартовых и пробиотических культур МКБ являются аэробное и дыхательное культивирование. В последнем случае МКБ выращивают в присутствии экзогенного гемина (лактококки) или гемина и менахинона (лактобациллы) [3–8]. Большинство МКБ относят к аэротолерантным анаэробам. У МКБ

отсутствуют гены полного пути биосинтеза гема, лишь представители некоторых родов, включая *Lactococcus*, могут синтезировать менахинон [3]. При дыхательном культивировании у некоторых МКБ может функционировать электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), состоящая из НАДН-дегидрогеназы, менахинона и хинолоксидазы *bd* (*CydAB*). Аэробный и дыхательный метаболизм наиболее исследован у *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* и *Lacticaseibacillus casei* [3–8]. МКБ, выращенные в дыхательных условиях, имеют большие выходы биомассы, а также демонстрируют повышенную устойчивость к окислительным стрессам, замораживанию, лиофильной сушке и длительному хранению по сравнению с анаэробными и аэробными культурами. В этой связи дыхательное культивирование представляется перспективным подходом для получения, хранения и реализации замороженных или лиофилизированных заквасок и пробиотических культур МКБ.

Не оставляет сомнения тот факт, что дыхательный метаболизм МКБ требует всестороннего изучения. Тем не менее, в настоящее время выводы о функционировании ЭТЦ у МКБ базируются главным образом на геномном анализе и увеличении выхода биомассы при дыхательном культивировании. Объектом настоящего исследования являлась гомоферментативная МКБ *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, обладающая пробиотическими свойствами [9]. В работе измерены скорости окисления НАДН препаратами мембран, выделенными из клеток МКБ. Впервые показано *in vitro*, что менахинон является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы к хинолоксидазе в ЭТЦ МКБ.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали: питательную среду MRS, KCN (Merck, Германия); гемин и фенилметансульфонилфторид (Fluka, Швейцария); витамин K_2 , дитиотреитол, duroхинон, НАДН, бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США).

Объект и условия культивирования. *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, выделенную на кафедре микробиологии МГУ из образца фекалий четырехмесячного младенца, выращивали на среде MRS (pH 6,5) в колбах объемом 250 мл с 15 мл среды в темноте при 220 об./мин и 37°C. Стерильные растворы гемина (2,5 мг/мл 50 mM NaOH) и витамина K_2 (1 мг/мл этанола) добавляли в стерильную среду в конечной концентрации 38 мкМ и 18 мкМ соответственно. Оптическую плотность (ОП) культуры измеряли при 650 нм. Посевным материалом (10–15%) служила суточная культура, выращенная статично при 37°C в микроаэробных условиях в закрытых резиновыми пробками и алюминиевыми крышками флаконах объемом 12 мл с 10 мл среды.

Получение мембранных фракций. Культуру конца логарифмической фазы роста (1 л) осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C), клетки трижды отмывали 50 mM К-фосфатным буфером (pH 7,0). Впоследствии клетки осаждали и отмывали, используя тот же режим центрифугирования. Полученные осадки клеток суспендировали в буфере и разрушали в ледяной бане на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (У-РосПрибор, Россия) мощностью 150 Вт с частотой 22 кГц в течение 10 мин (20 × 30 с) в присутствии 1 mM фенилметансульфонилфторида с последующим центрифугированием (20000 g, 40 мин, 4°C). Полученные экстракты клеток подвергали ультрацентрифугированию (150000 g, 3 ч, 4°C), после чего осадки мембран трижды отмывали буфером при тех же условиях, суспендировали в буфере и хранили при –20°C.

Полярографический анализ. Скорость поглощения кислорода измеряли с помощью кислородного электрода типа Кларка (Rank Brothers Ltd., Великобритания) в ячейке объемом 2 мл при 37°C. Отмытые от среды клетки или мембраны вносили в ячейку, содержащую 2 мл буфера. Реакцию начинали добавлением субстратов в конечных концентрациях: для мембран – 10 mM дитиотреитол (ДТТ) + 0,75 mM duroхинон, 1 mM НАДН и 0,2 mM витамин K_2 , а для клеток – 10 mM глюкоза. В случае ингибиторного анализа препараты мембран инкубировали с KCN в течение 1 мин в полярографической ячейке, затем последовательно добавляли НАДН и витамин K_2 в конечных концентрациях 1,0 и 0,2 mM соответственно. Скорости потребления O_2 рассчитывали, исходя из того, что в 1 мл буфера при 37°C растворено 210 нмоль O_2 .

Спектральный анализ. Спектры поглощения препаратов мембран регистрировали на однолучевом спектрофотометре Specord 50 (Analytik Jena AG, Германия) при комнатной температуре и длине оптического пути 1 см. Образцы восстанавливали сухим дитионитом натрия или окисляли сухим персульфатом аммония.

Определение глюкозы. Глюкозу в культуральной жидкости измеряли с помощью ФАД-зависимой глюкозодегидрогеназы из *Aspergillus* sp. при pH 7,0 и 30°C, используя глюкометр Contour TS (Bayer AG, Германия). Культуральные жидкости разводили 100 mM К-фосфатным буфером (pH 7,0) до конечных концентраций глюкозы 4–20 mM.

Определение сухой биомассы и белка. Культуру (10–15 мл) осаждали центрифугированием и трижды отмывали осадки клеток деионизированной водой. Массу центрифужных пробирок, пустых и с биомассой, доводили до постоянного веса при 90°C.

Белок определяли по методу Брэдфорда [10], используя бычий сывороточный альбумин (фракция V) в качестве стандарта.

Масс-спектрометрический анализ. Культуру (15 мл) осаждали и трижды отмывали от среды деионизированной водой центрифугированием. Осадки клеток суспендировали в 1 мл ацетона (ос.ч., -20°C), трижды отмывали ацетоном и сушили на воздухе при комнатной температуре до полного испарения ацетона. Сухие клетки суспендировали в 130–200 мкл 2%-ного лаурилсульфата натрия и инкубировали 20 мин при 95°C с последующим центрифугированием (20000 g, 20 мин, 4°C). Подготовку проб полученных экстрактов клеток для нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии (нано-ВЭЖХ) проводили по методу, изложенному ранее [11]. Нано-ВЭЖХ и последующую времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS/MS) проводили, как указано ранее [12] с помощью масс-анализатора 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, США). Масс-спектры анализировали с помощью внутренних баз данных, используя пакеты программ Scaffold (Proteome Software, Inc., США) и Sequest [13]. Коды доступа AC (accession code) идентифицированных ферментов соответствуют базе данных белков UniProt (<https://www.uniprot.org>).

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Данные представлены как «среднее $\pm$ стандартное отклонение» по результатам из трех независимых культивирований. Для оценки значимости различий использовали t-критерий Стьюдента. Анализируемые выборки происходили из генеральной совокупности, имеющей нормальное распределение в соответствии с W-критерием Шапиро-Уилка, $P > 0,05$ (Statistica v. 10.0).

Результаты и обсуждение

Для активации дыхательного метаболизма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 культивировали при интенсивной аэрации в присутствии гемина и витамина K_2 как источника менахинона (таблица). Контролем служила аэробная культура, выращенная без гемина и менахинона. Добавление в среду гемина или менахинона по отдельности не оказывало существенного влияния на ОП культуры по истечении 24 ч. Однако совместное их внесение в среду (дыхательные условия) приводило к увеличению ОП суточной культуры на 30% по сравнению с контролем (аэробные условия). В аэробных условиях выход биомассы составлял $2,26 \pm 0,01$ г сухих клеток/л, а в дыхательных — $2,86 \pm 0,05$ г сухих клеток/л ($p < 0,05$), или на 27% больше. В дыхательных условиях клетки полностью потребляли глюкозу по истечении 24 ч, тогда как в аэробных условиях остаточное содержание глюкозы в среде составляло $14,7 \pm 0,5$ ммоль/л, или около 10% от исходной концентрации. В этой связи значения

молярных экономических коэффициентов $Y_{P/S}$ определяли как количество сухой биомассы клеток, образованное на 1 моль использованной глюкозы после 18 ч культивирования. При этом в аэробных условиях оставалось около 25% от исходного содержания глюкозы в среде, а в дыхательных условиях — около 15%. Величины $Y_{P/S}$ составляли $20,1 \pm 1,0$ и $25,6 \pm 1,5$ г сухой биомассы/моль использованной глюкозы ($p < 0,05$) для клеток, выращенных в аэробных и дыхательных условиях соответственно. Таким образом, при культивировании *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в дыхательных условиях значение $Y_{P/S}$ превышало на 27% этот показатель для аэробных условий в отсутствие гемина и менахинона. Более эффективное использование глюкозы лактобациллой, выращенной в присутствии гемина и менахинона, очевидно, связано с получением клетками дополнительной энергии за счет окислительного фосфорилирования в ЭТЦ. Повышение выхода биомассы и урожая клеток в дыхательных условиях по сравнению с аэробными условиями наблюдали ранее в контролируемой периодической культуре *L. casei* N87 [5].

Таблица

Рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в аэробных и дыхательных условиях культивирования

Условия культивирования	ОП, 0 ч	ОП, 24 ч	pH, 24 ч
А: Контроль	$0,26 \pm 0,08$	$4,49 \pm 0,22$	$4,02 \pm 0,16$
А: Гемин	$0,26 \pm 0,06$	$4,55 \pm 0,19$	$4,03 \pm 0,13$
А: Менахинон	$0,28 \pm 0,06$	$4,71 \pm 0,21$	$3,94 \pm 0,12$
Д: Гемин + Менахинон	$0,28 \pm 0,08$	$5,84 \pm 0,15^*$	$4,25 \pm 0,03^{**}$

Примечания: А — аэробные условия; Д — дыхательные условия; ОП — оптическая плотность; * — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$; ** — статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$.

В дыхательных условиях значение pH культуральной жидкости по истечении 24 ч культивирования *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 было несколько выше по сравнению с аэробными условиями (таблица). Такой же эффект наблюдали в случае *Lactobacillus reuteri* FUA3168, *Lb. reuteri* DSM20016 и *Levilactobacillus spicheri* FUA3125 [14]. При этом в дыхательных условиях указанные культуры образовывали меньше лактата и ацетата, чем при росте в аэробных условиях на среде с менахиноном. Такое изменение pH, скорее всего, обусловлено тем, что в условиях функционирования ЭТЦ меньше пирувата превращается лактатдегидрогеназой (Ldh) в молочную кислоту. Как следствие этого, больше пирувата может окисляться пируватдегидрогеназой (Pdh) до ацетил-КоА и НАДН. При этом НАДН, который не пошел на образование лактата, вместе с НАДН, полученным в результате активности Pdh, может впоследствии окисляться в ЭТЦ. В пользу этой гипотезы свиде-

тelleствует тот факт, что ингибирование Ldh оксидом натрия при росте *Lc. lactis* IL1403 в дыхательных условиях сопровождалось стимуляцией аэробного дыхания и повышением выхода биомассы [4]. Снижение активности Ldh и повышение выхода биомассы наблюдали также у *L. casei* N87 при переходе от аэробных к дыхательным условиям в контролируемой периодической культуре с 30%-ным насыщением кислородом [5]. Напротив, по данным протеомного анализа уровень компонента E3 Pdh у *L. casei* N87 был выше в дыхательных условиях по сравнению с аэробными [7]. Повышение уровня экспрессии генов *pdh* в дыхательных условиях по сравнению с аэробными показано у *L. rhamnosus* N132 [14].

Компоненты ЭТЦ *L. rhamnosus* KM МГУ 529 исследовали с помощью спектрального анализа и масс-спектрометрии. На рис. 1 приведены разностные спектры поглощения препаратов мембран, выделенных из клеток конца логарифмической фазы роста, выращенных аэробно в присутствии гемина. Известно, что в этих условиях уровень экспрессии гена *cydA*, кодирующего субъединицу I хинолоксидазы *bd*, был максимальным у *Ly. spicheri* LP38, *L. rhamnosus* N132 и *L. casei* N87 [5, 14]. На нижнем спектре, когда цитохромы *b*-типа только частично восстановлены, хорошо виден широкий максимум при 617 нм, скорее всего, соответствующий α -полосе цитохрома *d*-типа. Последующее полное восстановление препаратов мембран дитионитом натрия выявило на верхнем спектре максимум поглощения при 559 нм, плечо при 533 нм и пик при 427 нм, принадлежащие α -, β - и γ -полосам цитохромов *b*-типа соответственно. Полученные спектральные характеристики близки к аналогичным значениям для очищенного цитохромного комплекса *bd* из *Bacillus stereothermophilus* [15], что свидетельствует в пользу присутствия хинолоксидазы *bd*-типа в мембранах *L. rhamnosus* KM МГУ 529. Препараты мембран штамма KM МГУ 529 окисляли донор электронов для хинолоксидазы (ДТТ/дурохинон) с высокой скоростью — $256,4 \pm 19,7$ нмоль O_2 /мин $\times$ мг белка.

НАДН-оксидазную активность мембран изучали на препаратах из клеток, выращенных аэробно в присутствии гемина. Мембраны окисляли 1 мМ НАДН со скоростью $89,4 \pm 5,1$ нмоль O_2 /мин $\times$ мг белка. Последующее внесение в реакционную смесь витамина K_2 в концентрации 0,2 мМ сопровождалось существенным увеличением скорости потребления кислорода мембранами, которая составляла $411,9 \pm 24,8$ нмоль O_2 /мин $\times$ мг белка. НАДН-оксидазную активность мембран в присутствии витамина K_2 подавлял цианид ($K_i = 6,2 \pm 0,2$ мМ). По всей вероятности, экзогенный менахинон переносит электроны от НАДН-дегидрогеназы к хинолоксидазе *bd*, которая, в свою очередь, непосредственно восстанавливает кислород.

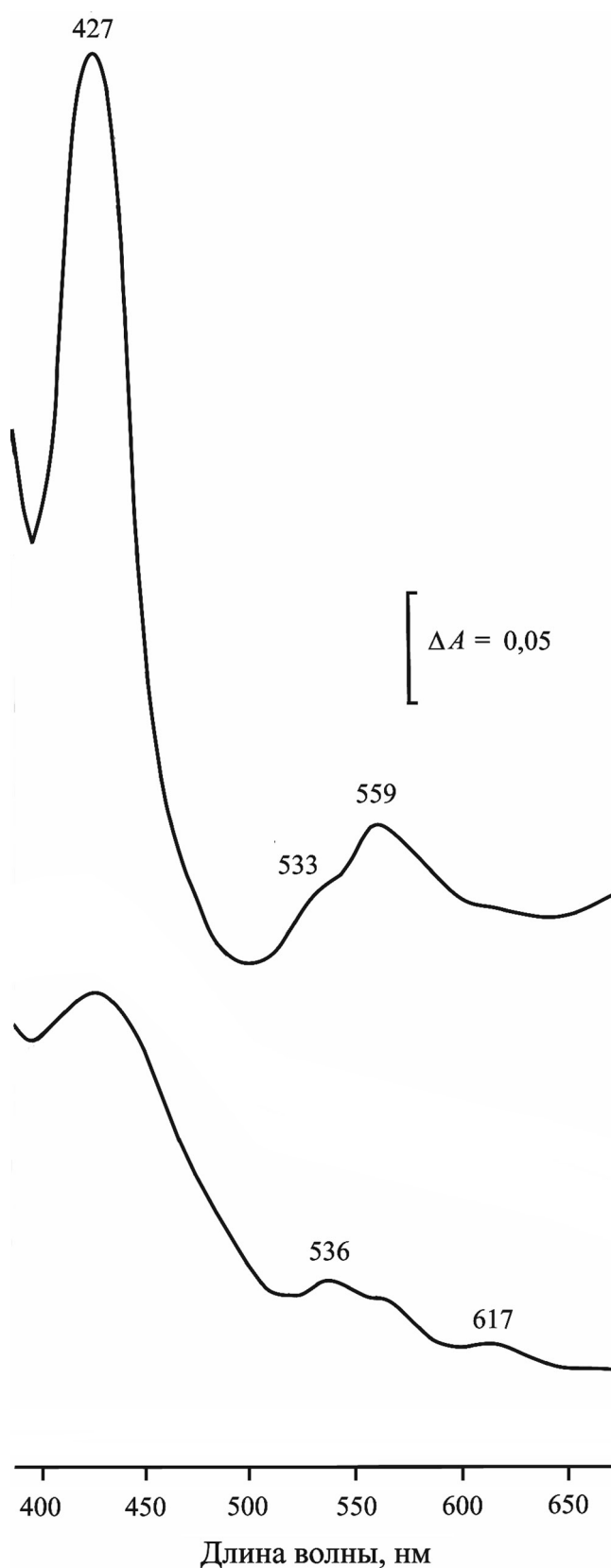


Рис. 1. Разностные спектры поглощения (восстановление дитионитом натрия минус окисление персульфатом аммония) мембранных фракций из *L. rhamnosus* KM МГУ 529, выращенной в присутствии гемина. Нижний спектр — неполное восстановление цитохромов *b*-типа, верхний — полное восстановление. Мембраны суспендированы (2,0 мг белка/мл) в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе, pH 7,0.

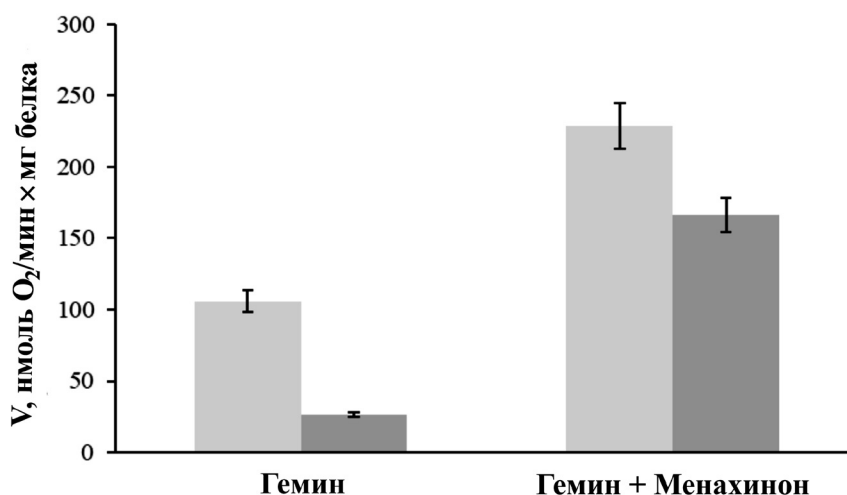


Рис. 2. Потребление кислорода целыми клетками *L. rhamnosus* KM МГУ 529 в присутствии глюкозы. Среда культивирования содержала гемин или гемин + менахинон; потребление кислорода отмытыми от среды клетками обозначено светлым цветом, а клетками после хранения при 0°C в течение суток — темным цветом. Реакционные смеси содержали 0,3–0,5 мг белка/мл.

Ферменты, участвующие в окислении мембранами НАДН, были идентифицированы с помощью MALDI-TOF tandemной масс-спектрометрии: пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза (АС C2K0C6, ген *nox-2*, 40,6% сходства); НАДН-дегидрогеназа 2 (АС F3MUB2, ген *AAULR_18781* (*ndh-2*), 41,6% сходства) и субъединица I убинолоксидазы *bd* (АС A0A249N3D0, ген *N507_0943* (*cydA*), 18% сходства). *Nox-2* переносит электроны и протоны от НАДН непосредственно на кислород с образованием воды [16]. *Ndh-2* передает электроны и протоны от НАДН на хинон, который затем окисляется хинолоксидазой *bd*-типа с образованием протондвижущей силы [17]. Добавление менахинона в реакционную смесь сопровождалось увеличением скорости окисления мембранами НАДН в 4,6 раза. Из соотношения скоростей следует заключить, что при этом 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду шло через *Ndh-2*, менахинон и хинолоксидазу и только 20% — через *Nox-2*.

Результаты изучения влияния дыхательного метаболизма на потребление *L. rhamnosus* KM МГУ 529 кислорода в присутствии глюкозы приведены на рис. 2. Целые клетки штамма KM МГУ 529, выращенные аэробно на среде с гемом, активно потребляли кислород в присутствии глюкозы. Внесение в ростовую среду менахинона сопровождалось двукратным увеличением скорости окисления клетками глюкозы, что, очевидно, является результатом встраивания менахинона в ЭТЦ и переноса им электронов от *Ndh-2* к хинолоксидазе *bd*-типа. После хранения клеточных суспензий при 0°C в течение 24 ч скорость окисления глюкозы снижалась на 75% у клеток из среды с гемом и лишь на 30% у клеток из среды с гемом и менахиноном. Таким образом, выращенные в дыхательных условиях клетки лактобациллы способны дольше сохранять метаболиче-

скую активность по отношению к глюкозе по сравнению с аэробными клетками, выращенными на среде с гемом. Интересно, что клетки *Lc. lactis* IL1403 с активированным дыхательным метаболизмом оставались жизнеспособными после хранения при 4°C в течение нескольких месяцев, тогда как клетки с броидильным метаболизмом — менее 20 сут [10].

Таким образом, в работе приведены экспериментальные свидетельства в пользу функционирования ЭТЦ у гомоферментативной МКБ *L. rhamnosus* KM МГУ 529 при аэробном культивировании в присутствии гема и менахинона. Показано, что в мембранах из клеток, выращенных аэробно на среде с гемом, 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду идет через ЭТЦ при наличии экзогенного менахинона. Клетки *L. rhamnosus* KM МГУ 529 с активированным дыхательным метаболизмом более эффективно использовали глюкозу и дольше сохраняли метаболическую активность по сравнению с клетками, выращенными в аэробных условиях. Всестороннее изучение дыхательного метаболизма МКБ создает перспективы для повышения выхода биомассы пробиотических культур, отличающихся высокой устойчивостью к окислительным стрессам, замораживанию, лиофильной сушке и длительному хранению, не прибегая при этом к методам генетической инженерии.

Исследование выполнено в рамках госзадания по теме кафедры микробиологии МГУ «Физиология и биохимия фототрофных и хемотрофных микроорганизмов» (№ 121032300094-7). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. Vol. 11. N 8. P. 506–514.
2. Moslem P., Hossein N., Mahdi R., Seyed N.H., Seyed A.S. *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG): a top well-researched probiotic strain // J. Med. Microbiol. 2017. Vol. 5. N 5–6. P. 46–59.
3. Pedersen M.B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M.A., Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2012. Vol. 3. P. 37–58.
4. Arioli S., Zambelli D., Guglielmetti S., De Noni I., Pedersen M.B., Pedersen P.D., Dal Bello F., Mora D. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase // Appl. Environ. Microbiol. 2013. Vol. 79. N 1. P. 376–380.
5. Ianniello R.G., Zotta T., Matera A., Genovese F., Parente E., Ricciardi A. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 // PLoS One. 2016. Vol. 11. N 11: e0164065.
6. Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry // J. Appl. Microbiol. 2017. Vol. 122. N 4. P. 857–869.
7. Siciliano R.A., Pannella G., Lippolis R., Ricciardi A., Mazzeo M. F., Zotta T. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lactobacillus casei* N87 proteome // Int. J. Food Microbiol. 2019. Vol. 298. P. 51–62.
8. Johanson A., Goel A., Olsson L., Franzén C.J. Respiratory physiology of *Lactococcus lactis* in chemostat cultures and its effect on cellular robustness in frozen and freeze-dried starter cultures // Appl. Environ. Microbiol. 2020. Vol. 86. N 6: e02785–19.
9. Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. In vitro evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2020. Vol. 12. N 3. P. 1139–1148.
10. 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. P. 248–254.
11. Teteneva N.A., Mart'yanov S.V., Esteban-López M., Kahnt J., Glatter T., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Sourjik V. Multiple drug-induced stress responses inhibit formation of *Escherichia coli* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2020. Vol. 86. N 21: e01113–20.
12. Wagner T., Wegner C.E., Kahnt J., Ermler U., Shima S. Phylogenetic and structural comparisons of the three types of methyl coenzyme M reductase from *Methanococcales* and *Methanobacteriales* // J. Bacteriol. 2017. Vol. 199. N 16: e00197–17.
13. Eng J.K., McCormack A.L., Yates J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994. Vol. 5. N 11. P. 976–989.
14. Ianniello R.G., Zheng J., Zotta T., Ricciardi A., Gänzle M.G. Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri* // J. Appl. Microbiol. 2015. Vol. 119. N 3. P. 763–775.
15. Sakamoto J., Koga E., Mizuta T., Sato C., Noguchi S., Sone N. Gene structure and quinol oxidase activity of a cytochrome *bd*-type oxidase from *Bacillus stearothermophilus* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1411. N 1. P. 147–158.
16. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // Biomedicines 2021, Vol. 9. N 10: e1340.
17. Marreiros B.C., Sena F.V., Sousa F.M., Batista A.P., Manuela M. Pereira M.M. Type II NADH: quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences // Environ. Microbiol. 2016. Vol. 18. N 12. P. 4697–4709.

Поступила в редакцию 16.05.2022

После доработки 21.07.2022

Принята в печать 25.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Vitamin K₂ mediates electron transport from NADH dehydrogenase 2 to *bd*-type quinol oxidase in *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529

T.Y. Dinarieva^{1,*}, A.I. Klimko¹, T.A. Cherdyntseva¹,
A.L. Bryukhanov¹, A.I. Netrusov^{1,2}

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

²Faculty of Biology and Biotechnology, High School of Economics, Mjasnitskaja 20, Moscow, 101000, Russia

*e-mail: dinarieva@mail.ru

§contributed equally

To activate respiratory metabolism *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529 was grown in a batch culture under intensive aeration in the presence of 38 μM hemin and 18 μM vitamin K₂ as a source of menaquinone. Unsupplemented aerobic culture served as a control. Supplementation of the growth medium with hemin or menaquinone separately had no significant effect on culture growth. Biomass concentration of 2,86 ± 0,05 g dw cells/l and the

yield coefficient for biomass $Y_{P/S}$ of $25,6 \pm 1,5$ g dw cells/mol glucose consumed were determined after 24 h and 18 h of cultivation under respiratory conditions (hemin + K_2) respectively. Both values were 27% higher compared to those for aerobic conditions. Spectral analysis revealed the presence of cytochromes *b*- and *d*-type in membranes of *L. rhamnosus* CM MSU 529. The activity of bacterial electron transport chain was investigated by polarographic technique. Membrane preparations obtained from cells grown aerobically on hemin-containing medium intensively consumed oxygen in the presence of 1 mM NADH. Addition of 0.2 mM menaquinone to reaction mixture caused the increase of NADH oxidation rate by 4.6 fold. Enzymes presumably involved in NADH oxidation by membranes were identified using MALDI-TOF MS/MS: pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase (Nox-2), NADH dehydrogenase 2 (Ndh-2), and ubiquinol oxidase *bd* subunit I (CydA). Thus, during NADH oxidation 80% of electron transport from NADH to oxygen went via Ndh-2, menaquinone, *bd*-type quinol oxidase and only 20% – via Nox-2. The study presents experimental evidence for electron transport chain functioning in *L. rhamnosus* CM MSU 529 during aerobic cultivation with hemin and menaquinone. The NADH oxidation rates of membrane preparations of lactic acid bacteria were measured for the first time. The property of exogenous menaquinone to transfer electrons from Ndh-2 to *bd*-type quinol oxidase was demonstrated for the first time *in vitro* in lactic acid bacteria.

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, respiration, electron-transport chain, NADH dehydrogenase 2, quinol oxidase *bd*, Nox-2

Funding: The study was performed within the framework of the state task on the topic of the Department of Microbiology of MSU “Physiology and Biochemistry of Phototrophic and Chemotrophic Microorganisms” (project number 121032300094-7).

Сведения об авторах

Динариева Татьяна Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: dinarieva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9081-0688>

Климко Алена Игоревна — аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: alenaklimko221@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6188-6525>

Чердынцева Татьяна Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: taniacherd@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8764-0200>

Брюханов Андрей Леонидович — канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: brjuchanov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1807-297X>

Нетрусов Александр Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-83; e-mail: anetrusov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.152.34:582.282.123.4

Протеолитические ферменты микромицетов рода *Aspergillus*, гидролизующие фибриллярные белки, для биомедицины и биотехнологических процессов**С.Н. Тиморшина , Е.А. Попова , А.А. Галиакберова, А.Г. Очнева, А.А. Осмоловский* ***Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: aosmol@mail.ru*

Фибриллярные белки играют значительную роль в функционировании живых организмов, а в последнее время к ним обращено большое внимание как к мишеням при терапии и диагностике различных заболеваний, субстратам для производства биополимеров, а также промышленно значимым белкам, играющим важную роль при производстве текстильных изделий и продуктов питания. Для реализации развития этих направлений необходимы методы гидролиза и обработки фибриллярных белков, наиболее перспективные из которых — применение протеолитических ферментов. Было изучено 11 ферментных препаратов, полученных при культивировании микромицетов рода *Aspergillus* с последующими высаливанием и диализом внеклеточных белков и содержащих от 1 до 10 белков, на способность гидролизовать фибриллярные белки: коллаген, кератин, фибрин и эластин. Протеолитические ферменты культур *A. alliaceus* 7dN1, *A. clavatus* A16 и *A. ustus* 1 показали активность, сопоставимую с активностью коммерческого препарата «Терилитин», используемого при раневой терапии, или выше. Ферментный препарат *A. fumigatus* D1 также проявил высокую фибринолитическую активность.

Ключевые слова: протеазы, фибриллярные белки, коллагеназы, кератиназы, фибринолитические ферменты, эластазы, *Aspergillus*

Фибриллярные белки широко представлены в организме различных животных и, как правило, выполняют структурные функции [1]. Коллаген и эластин являются основными белками внеклеточного матрикса соединительной ткани [2], кератин — входит в состав рогового слоя эпидермиса и его производных [3], а фибрин — основной компонент тромба — является критически важным белком гемостаза [4]. Однако их чрезмерное накопление или несвойственная локализация могут приводить к разнообразным заболеваниям, среди которых наиболее распространены тромбозы, фиброматозы и кератозы, что обеспечивает в медицинской практике высокий интерес к препаратам, способным к деградации фибриллярных белков [4, 5]. Такие препараты также применяются в терапии травматических повреждений кожного покрова — ран и ожогов, приводящих к образованию некротического компонента, богатого коллагеном и эластином [6]. Ферментные препараты, способные к эффективному гидролизу коллагена и кератина, также находят широкое применение в различных отраслях промышленности: в легкой и текстильной их используют для обработки шкур и меха, а в пищевой — применяют для тендеризации мяса. Не менее важной и перспективной сфе-

рой применения кератиназ и коллагеназ является биodeградация отходов животноводства. Продукты ферментативного гидролиза кератино- и коллагеносодержащих отходов, таких как куриное перо, свиная щетина, рога, копыта и хрящи, представляют собой смесь коротких пептидов и аминокислот, которую в дальнейшем можно использовать в качестве кормовых добавок и биодобавок [7].

Востребованность ферментов, высокоактивных в отношении фибриллярных белков, и разнообразие задач, для которых их применяют, обуславливают неугасающий интерес ученых к разработке новых способов их получения и поиску эффективных продуцентов. Одним из перспективных направлений исследований в этой области является изучение протеаз, образуемых мицелиальными грибами, так как они способны к синтезу широкого спектра протеолитических ферментов, в том числе с высокими значениями активности по отношению к фибриллярным белкам [8–11].

В рамках данного исследования была изучена ферментативная активность в отношении коллагена, кератина, эластина и фибрина протеаз, входящих в состав препаратов внеклеточных белков, 11 штаммов грибов рода *Aspergillus*.

Материалы и методы

Реактивы. Субстраты для анализа протеолитической активности, реактивы для электрофореза, а также коммерческие препараты трипсина (рН оптимум 7,8–8,0) и кислой протеазы *Aspergillus saitoi* (рН оптимум около 2,8) были приобретены у производителя «Sigma-Aldrich» (США). В исследовании были использованы соли, кислоты и другие реактивы фирмы «Panreac» (Испания). Изучаемые ферментные препараты также сравнили с коммерческим препаратом «Террилитин» производства Санкт-Петербургского научно-исследовательского института вакцин и сывороток, основным компонентом которого является протеаза *A. terreicola*, используемая в медицине для заживления ран (рН оптимум около 8).

Получение препаратов внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*. Получение ферментных препаратов осуществляли путем двухстадийного глубинного культивирования 11 штаммов микромицетов рода *Aspergillus* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. На первом этапе мицелиальные грибы культивировали в 100 мл богатой углеводами среды (сусло – 6,7%, глюкоза – 2,0%, пептон – 0,1%; рН 5,5) в колбах Эрленмейера (750 мл) при 28°C и 200 об./мин в течение 2 сут для накопления биомассы. Затем 3% от объема биомассы переносили в ферментационные среды, подобранные для получения внеклеточных протеолитических ферментов микромицетов в предыдущих исследованиях [12–15]. Условия культивирования были аналогичными первому этапу (100 мл среды, 28°C, 200 об./мин). В день накопления максимальной протеолитической активности секретируемые микромицетами белки осаждали сульфатом аммония из отфильтрованной от биомассы культуральной жидкости (608 г сульфата аммония на 1 л культуральной жидкости). После 48 ч инкубации при 4°C белки центрифугировали при 3160 g и 4°C в течение 45 мин в центрифуге LMC-4200R (Biosan, Латвия). Осадки растворяли в 0,01 М Трис-НСl буфере (рН 8,2) и подвергали диализу против 0,005 М буфера Трис-НСl (рН 8,2) в течение 24 ч перед повторным центрифугированием в аналогичных условиях. Супернатанты замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученные порошки препаратов внеклеточных белков грибов *Aspergillus* хранили при температуре –20°C.

Определение количества белка. Определение количества белка проводили с бицинхониновой кислотой [16]. К 50 мкл растворов белковых препаратов в дистиллированной воде с концентрацией 2 мг/мл добавляли 950 мкл раствора В перед измерением оптической плотности смеси при 562 нм с помощью спектрофотометра BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия). Раствор В готовили в день проведения реакции

путем смешивания раствора А (бицинхониновая кислота – 1,0%, Na₂CO₃ – 2,0%, виннокислый натрий – 0,16%, NaOH – 0,4%, NaHCO₃ – 0,95%; рН 11,25) и раствора Б (CuSO₄ – 4,0%) в соотношении 50 к 1 соответственно. Для расчета количества белка в ферментных препаратах строили калибровочную кривую с использованием бычьего сывороточного альбумина.

Электрофоретический анализ белкового состава ферментных препаратов. Электрофорез нативных белков в полиакриламидном геле проводили по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере (рН 8,3) с концентрацией акриламида в концентрирующем геле 6,0% и в разделяющем геле – 7,5%. Белки разделяли при силе тока 25 мА. Гель окрашивали 0,08%-ным раствором кумасси бриллиантового синего G-250 в 3,5%-ной хлорной кислоте в течение 30 мин. Для удаления красителя из геля использовали 7%-ную уксусную кислоту.

Анализ протеолитической активности. Для определения протеолитической активности препаратов внеклеточных белков грибов рода *Aspergillus* использовали суспензии различных окрашенных белковых субстратов: азоказеина, азоколлагена, Hide Powder Azure (НРА), эластина-конго красного (ЭКК) и кератин-азура, приготовленных на 0,05 М Трис-НСl-буфере (рН 8,2), а также фибрина голубого – на 0,05 М ацетатном буфере (рН 5,5). Реакции проводили с 200 мкл 0,2%-ных суспензий азоказеина, азоколлагена, ЭКК и фибрина голубого, а также с 2%-ной суспензией НРА. К субстратам добавляли 100 мкл пробы. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 30 мин при гидролизе азоказеина и фибрина голубого, 24 ч – при реакциях с азоколлагеном или НРА и 48 ч – для разрушения ЭКК в термошейкерах TS-24 (Biosan, Латвия) при 600 об./мин (азоказеинолиз и гидролиз фибрина голубого) и 750 об./мин (азоколлагенолиз, гидролиз НРА и ЭКК). Все реакции останавливали добавлением 300 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем образцы центрифугировали в течение 5 мин при 12100 g с помощью центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия) перед измерениями оптической плотности при 340 нм (азоказеин), 520 нм (азоколлаген), 595 нм (НРА), 495 нм (ЭКК) и 620 нм (фибрин голубой) с помощью спектрофотометра BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия).

Для изучения кератинолитической активности 10 мг кератин-азура добавляли к 100 мкл 0,05 М Трис-НСl-буфера (рН 8,2) и 200 мкл пробы. Смесь инкубировали 48 ч при 37°C (750 об./мин). Реакцию останавливали и затем смесь центрифугировали, как описано выше. Измерения оптической плотности проводили при 595 нм.

За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало изменение оптической плотности на 0,01 ед. в условиях проведения реакции.

Активность ферментных препаратов в отношении фибриллярных белков, кроме того, определяли модифицированным методом Аструпа-Мюллерца-Лассена с использованием фибриновых пластин [17]. Для проведения эксперимента получали фибриновые пластины двух типов: стандартные (только с фибрином) и смешанные (с фибрином, коллагеном и эластином). Для приготовления стандартных фибриновых пластин в чашках Петри ($d = 9$ см) смешивали 900 мкл 0,3%-ного раствора бычьего фибриногена и 200 мкл 0,2%-ного раствора тромбина в физиологическом растворе. Суспензию 0,3%-ного фибриногена, 0,5%-ного коллагена и 0,5%-ного эластина использовали для получения смешанных пластин. Формирование и стабилизация фибринового геля происходили в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем фибриновые пластины прогревали 30 мин при 86°C для инактивации плазминогена, находящегося в качестве примеси в фибриногене быка. Для измерения протеолитической активности на пластины наносили пробы объемом 30 мкл и инкубировали их в течение 3 ч при 37°C . После этого измеряли площади зон лизиса. Данные были выражены в усл. ед./мг. За 1 усл. ед. принимали количество фермента, формирующего зону гидролиза фибриновой пластинки, равную 1 мм^2 .

Все измерения проводили в трех повторностях. Данные рассчитывали как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Результаты определения ферментативной активности и количества белка в препаратах изучаемых культур рода *Aspergillus* представлены в таблице. Для измерения протеолитической активности готовили растворы 11 препаратов внеклеточных белков (2 мг/мл), синтезируемых микромицетами. Для сравнения использовали три коммерческих

препарата той же концентрации: кислую протеазу *Aspergillus saitoi*, трипсин и террилитин.

Из исследованных ферментных препаратов мицелиальных грибов все, кроме белков, секретированных *A. flavipes* A17, проявляли высокую общую протеолитическую активность, которую измеряли при проведении реакций с двумя субстратами: азоказеином и НРА. Внеклеточные протеазы *A. candidus* A6 также эффективно гидролизировали НРА, однако обладали относительно невысоким уровнем активности по отношению к азоказеину. Среди коммерческих ферментов только протеаза *A. saitoi* показала незначительную общую протеолитическую активность в условиях проведения реакций, что обусловлено ее рН-оптимумом, лежащим в кислой области. Ферментативная активность в отношении азоколлагена была сравнительно высокой у белков трех штаммов: *A. raperi* A13, *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16. Ферментные препараты этих культур гидролизировали азоколлаген эффективнее коммерческих, в том числе террилитина, что говорит об их перспективности в качестве агентов для раневой терапии. Препараты всех штаммов *Aspergillus* показали низкую способность к гидролизу кератин-азура – наиболее труднорастворимого субстрата из использованных. Внеклеточные белки *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16 были более активны в реакциях с кератин-азуром по сравнению с другими изучаемыми препаратами, и значения их активности были сопоставимы с кератинолитической активностью террилитина, а также выше, чем у трипсина и коммерческой протеазы *A. saitoi*. Значительный уровень деградации фибрина голубого наблюдался при реакциях с белковыми препаратами *A. ochraceus* L-1, *A. fumigatus* D1 и *A. raperi* A13. Активность этих препаратов существенно превосходила уровень фибринолиза с использованием коммерческих аналогов. Полученные

Таблица

Протеолитическая активность и количество белка в препаратах внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*

Культуры	Ферментативная активность в отношении различных окрашенных белковых субстратов, Е						Количество белка, мкг/мл
	азоказеин	азоколлаген	кератин-азур	ЭКК	фибрин голубой	НРА	
<i>A. terreus</i> 2	$93 \pm 1,19$	$8,4 \pm 1,37$	$4,0 \pm 0,34$	$0,90 \pm 0,21$	$12,2 \pm 3,73$	$71 \pm 6,65$	$248,85 \pm 1,72$
<i>A. fumigatus</i> D1	$93 \pm 0,66$	$6,3 \pm 0,15$	$1,0 \pm 0,72$	$0,50 \pm 0,06$	$20,0 \pm 2,20$	$83 \pm 3,95$	$462,52 \pm 10,03$
<i>A. ochraceus</i> L-1	$89 \pm 0,68$	$9,6 \pm 0,00$	$9,0 \pm 1,71$	$1,70 \pm 0,06$	$30,0 \pm 2,45$	$86 \pm 2,33$	$359,30 \pm 2,41$
<i>A. flavus</i> 1	$100 \pm 0,92$	$3,9 \pm 0,25$	$6,5 \pm 0,76$	$0,20 \pm 0,10$	$9,7 \pm 1,17$	$98 \pm 3,64$	$535,98 \pm 2,68$
<i>A. sydowii</i> 1	$102 \pm 0,32$	$4,1 \pm 0,35$	$3,7 \pm 0,15$	$0,53 \pm 0,03$	$6,3 \pm 1,75$	$86 \pm 4,51$	$257,43 \pm 3,14$
<i>A. clavatus</i> A16	$95 \pm 0,27$	$15,3 \pm 0,39$	$10,5 \pm 0,00$	$2,00 \pm 0,10$	$8,0 \pm 1,55$	$77 \pm 0,65$	$1709,91 \pm 8,53$
<i>A. alliaceus</i> 7dN1	$80 \pm 0,45$	$20,5 \pm 2,95$	$13,3 \pm 0,10$	$1,20 \pm 0,15$	$0,0 \pm 0,00$	$95 \pm 0,75$	$641,61 \pm 10,72$
<i>A. ustus</i> 1	$95 \pm 0,20$	$10,5 \pm 0,52$	$4,5 \pm 0,20$	$0,67 \pm 0,12$	$0,0 \pm 0,00$	$93 \pm 1,25$	$858,58 \pm 5,93$
<i>A. flavipes</i> A17	$2 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,07$	$2,4 \pm 1,50$	$0,20 \pm 0,12$	$12,2 \pm 0,65$	$60 \pm 0,55$	$816,94 \pm 5,36$
<i>A. raperi</i> A13	$89 \pm 0,52$	$23,0 \pm 1,35$	$7,7 \pm 0,72$	$0,13 \pm 0,03$	$19,7 \pm 4,25$	$86 \pm 0,38$	$984,25 \pm 7,88$
<i>A. candidus</i> A6	$56 \pm 0,10$	$3,2 \pm 0,12$	$6,1 \pm 0,44$	$1,20 \pm 0,17$	$0,0 \pm 0,00$	$82 \pm 4,30$	$783,70 \pm 2,33$
<i>A. saitoi</i>	$2 \pm 0,09$	$0,7 \pm 0,12$	$7,5 \pm 0,98$	$0,17 \pm 0,17$	$9,1 \pm 0,30$	$3 \pm 0,20$	$188,26 \pm 1,88$
трипсин	$77 \pm 0,18$	$10,2 \pm 1,81$	$0,0 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,12$	$0,0 \pm 0,00$	$95 \pm 0,75$	$560,38 \pm 3,70$
террилитин	$100 \pm 0,10$	$10,5 \pm 0,75$	$10,1 \pm 0,45$	$0,00 \pm 0,00$	$0,0 \pm 0,00$	$97 \pm 0,95$	$470,97 \pm 3,54$

при культивировании коллекционных штаммов и коммерческие препараты не обладали существенной способностью гидролизовать ЭКК, что указывает на низкий уровень патогенности их продуцентов [18–20]. Также стоит отметить, что ни один из коммерческих препаратов не обладал высокой активностью в отношении фибриллярных белков, а количество белка во всех исследованных препаратах сильно различалось. Количество белка сильно варьировало у разных препаратов, что, по-видимому, обусловлено продуцентом и условиями культивирования, однако корреляции между количеством белка и активностью препаратов не было.

Способность ферментных препаратов гидролизовать фибриллярные белки также была изучена модифицированным методом Аструпа-Мюллерца-Лассена с использованием фибриновых пластин. Стандартные пластины содержали только фибрин, смешанные — фибрин, коллаген и эластин для имитации состава кожной раны. Результаты измерения активности показаны на рис. 1.

Эксперименты с фибриновыми пластинами частично подтвердили результаты, полученные при измерении ферментативной активности с окрашенными субстратами спектрофотометрически. Однако наибольшую активность показал трипсин, тогда как из полученных в лабораторных условиях препаратов наиболее эффективно гидролизовали фибриллярные белки протеазы микромицета *A. ustus* 1. Уровень их активности был сопоставим с действием террилитина, но последний был менее активен при использовании смешанных пластин. Стоит отметить, что для большинства препаратов различия активности в отношении стандартных и смешанных пластин оказались незначительными, за исключением трипсина, террилитина, а также белков мицелиальных грибов *A. fumigatus* D1 и *A. flavus* 1. Такие различия могут быть связаны как с субстратной специфичностью отдельных ферментов, так и с наличием в ферментных препаратах нескольких белков. Для определения количества белков в ферментных

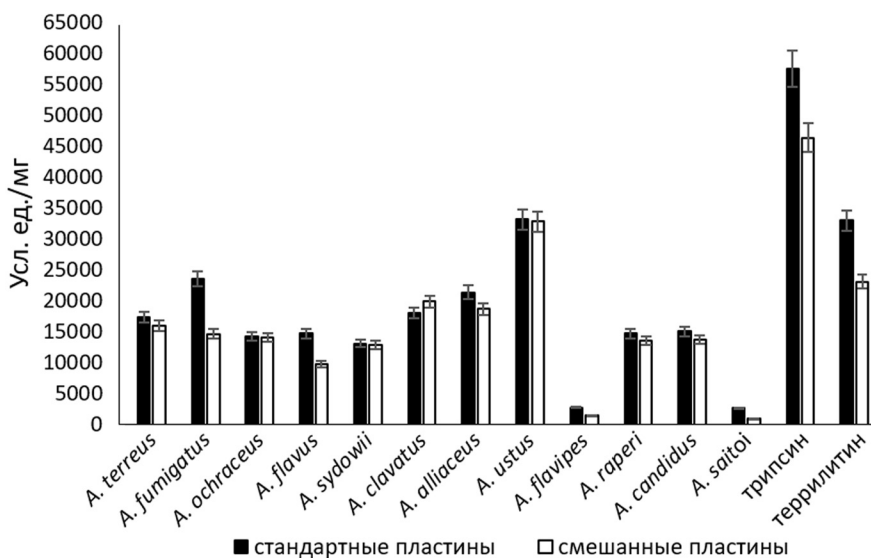


Рис. 1. Активность в отношении фибриллярных белков препаратов внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*.

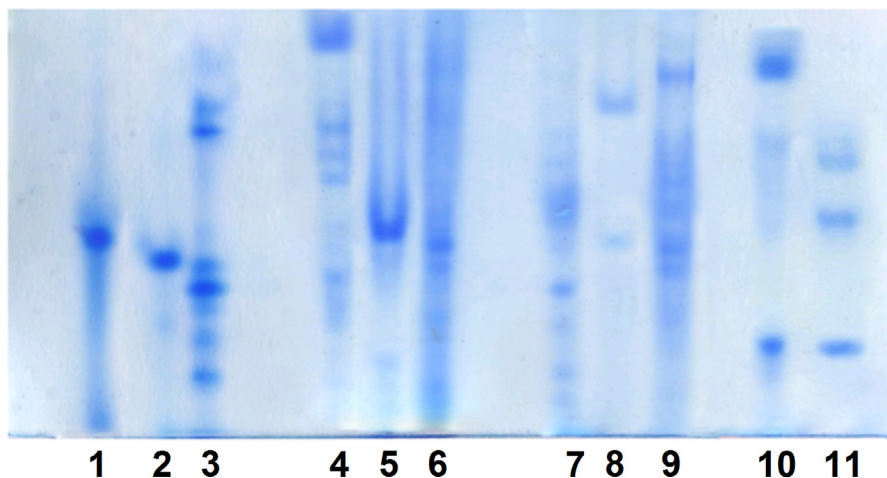


Рис. 2. Нативный электрофорез в полиакриламидном геле препаратов внеклеточных белков микромицетов рода *Aspergillus*: 1 — *A. fumigatus* D1, 2 — *A. ustus* 1, 3 — *A. raperi* A13, 4 — *A. sydowii* 1, 5 — *A. terreus* 2, 6 — *A. flavipes* A17, 7 — *A. alliaceus* 7dN1, 8 — *A. ochraceus* L-1, 9 — *A. clavatus* A16, 10 — *A. flavus* 1, 11 — *A. candidus* A6.

препаратах был проведен нативный электрофорез в полиакриламидном геле (рис. 2).

Ферментные препараты изучаемых грибов были различны по количеству белков: от одного (*A. fumigatus* D1, *A. ustus* 1) до более десяти (*A. sydowii* 1, *A. alliaceus* 7dN1). Действительно, ферментные препараты *A. fumigatus* D1 и *A. flavus* 1 оказались малокомпонентными (один и два основных белка соответственно), что может объяснять узкий спектр субстратов, которые способны гидролизовать эти ферменты. Однако препарат *A. ustus* 1, также содержащий лишь один полипептид, показал наибольшую активность со стандартными и смешанными пластинами среди изучаемых внеклеточных белков микромицетов, что говорит о его широкой субстратной специфичности по отношению к фибриллярным белкам и подтверждается предыдущими исследованиями протеаз этой культуры [9]. Препараты грибов *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16, наиболее перспективные по результатам измерения активности спектрофотометрически, были многокомпонентными. Однако для заключения о количестве и активности отдельных протеаз в этих препаратах недостаточно данных.

Таким образом, микромицеты рода *Aspergillus* представляются перспективными продуцентами

протеаз, гидролизующих фибриллярные белки и востребованных в различных областях от медицины до биodeградации. Культура *A. fumigatus* D1 проявила высокую активность по отношению к фибрину как при слабокислой реакции среды, так и при нейтральном pH, что говорит о стабильности ферментов этого штамма и возможности их применения в широких диапазонах значения pH, что бывает важно при промышленных обработках материалов. Содержание же лишь одного белка в препарате *A. fumigatus* D1 облегчит его очистку и позволит использовать в фармацевтике. Многокомпонентные препараты *A. alliaceus* 7dN1 и *A. clavatus* A16 обладают способностью к разрушению широкого спектра фибриллярных белков, что указывает на их перспективность в качестве агентов для биodeградации. Возможно, однокомпонентный препарат *A. ustus* 1, показавший активность, сопоставимую с действием терилитина, может стать альтернативным агентом для раневой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00674). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yeo J., Jung G., Tarakanova A., Martín-Martínez F.J., Qin Z., Cheng Y., Zhang Y.W., Buehler M.J. Multiscale modeling of keratin, collagen, elastin and related human diseases: Perspectives from atomistic to coarse-grained molecular dynamics simulations // *Extreme Mech. Lett.* 2021. Vol. 20. P. 112–124.
2. Sweeney S.M., Orgel J.P., Fertala A., McAuliffe J.D., Turner K.R., Di Lullo G.A., Barnes A.M., Marini J.C., San Antonio J.D. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 30. P. 21187–21197.
3. Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A., Langbein L., Lane E.B., Magin T.M., Maltais L., Omary M.B., Parry D.A.D., Rogers M.A., Wright M.W. New consensus nomenclature for mammalian keratins // *J. Cell Biol.* 2006. Vol. 174. N 2. P. 169–174.
4. Libby P., Bonow R.O., Mann D.L., Tomaselli G.F., Bhatt D., Solomon S.D., Braunwald E. Braunwald's heart disease-e-book: A textbook of cardiovascular medicine. Elsevier, 2021. 2032 pp.
5. Chen N.C., Srinivasan R.C., Shauver M.J., Chung K.C. A systematic review of outcomes of fasciotomy, aponeurotomy, and collagenase treatments for Dupuytren's contracture // *Hand.* 2011. Vol. 6. N 3. P. 250–255.
6. Erdevi O., Atasay B., Arsan S. Collagenase application for amputation in a preterm // *Pediatr. Dermatol.* 2007. Vol. 24. N 2. P. 195–196.
7. Hassan M.A., Abol-Fotouh D., Omer A.M., Tamer T.M., Abbas E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: A review // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. Vol. 154. P. 567–583.
8. Kumar J., Singh I., Kushwaha R.K.S. Keratinophilic fungi: Diversity, environmental and biotechnological implications // *Progress in Mycology* / Eds. T. Satyanarayana, S.K. Deshmukh, and M.V. Deshpande. Singapore: Springer, 2021. P. 419–436.
9. 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-proteins hydrolysis // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. Vol. 57. N 2. P. 200–205.
10. Kate S., Pethe A. Study of collagenase production by *Penicillium* sp. isolated from deteriorated leather sample // *J. Adv. Sci. Res.* 2022. Vol. 13. N 01. P. 227–234.
11. Cardoso K.B.B., Nascimento M.C., Batista A.C., de Melo Oliveira V., Nascimento T.P., da Silva Batista J.M., Costa R.M.P.B., Pastrana L., Porto A.L.F. Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes // *Res., Soc. Dev.* 2022. Vol. 11. N 2: e13611225449.
12. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. Продукция протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью микромицетом *Aspergillus terreus* // Прикл. биохим. микробиол. 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
13. Попова Е.А., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Котова И.Б., Егоров Н.С. Продукция штаммом *Aspergillus ustus* протеиназ, высокоактивных в отношении фибриллярных белков // Микол. фитопатол. 2019. Т. 53. № 4. С. 229–235.
14. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Komarevtsev S.K., Kreyer V.G., Shabunin S.V., Egorov N.S. Action of extracellular proteases of *Aspergillus flavus* and

Aspergillus ochraceus micromycetes on plasma hemostasis proteins // Life. 2021. Vol. 11. N 8: 782.

15. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Effect of proteinase from *Aspergillus fumigatus* on blood plasma proteins // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2021. Vol. 76. N 2. P. 71–76.

16. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid // Anal. Biochem. 1985. Vol. 150. N 1. P. 76–85.

17. Фокичев Н.С., Корниенко Е.И., Шаркова Т.С., Крейер В.Г., Осмоловский А.А. Тромболитическая активность и свойства препарата протеиназ, образуемых микромицетом *Tolypocladium inflatum* k1 // Микол. фитопатол. 2021. Т. 55. № 6. С. 449–456.

18. Kothary M.H., Chase T. Jr., Macmillan J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice // Infect. Immun. 1984. Vol. 43. N 1. P. 320–325.

19. Tamura Y., Suzuki S., Sawada T. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice // Microb. Pathog. 1992. Vol. 12. N 3. P. 237–244.

20. Khosravi A.R., Mahdavi Omran S., Shokri H., Lotfi A., Moosavi Z. Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis // J. Mycol. Med. 2012. Vol. 22. N 2. P. 167–172.

Поступила в редакцию 21.06.2022

После доработки 28.07.2022

Принята в печать 29.07.2022

RESEARCH ARTICLE

***Aspergillus* proteolytic enzymes hydrolyzing fibrillar proteins for biomedicine and biotechnological process**

S.N. Timorshina , E.A. Popova , A.A. Galiakberova, A.G. Ochneva, A.A. Osmolovskiy* 

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

*e-mail: aosmol@mail.ru

Fibrillar proteins play a significant role in the living organisms functioning, and recently much attention has been paid to them as targets in the therapy and diagnosis of various diseases, substrates for the biopolymers production, as well as industrially important proteins that are key agents in the textile and food manufacture. To implement the development of these directions, fibrillar proteins hydrolysis and processing methods are needed, the most promising of which is the use of proteolytic enzymes. 11 enzyme preparations obtained by cultivation of micromycetes belong to the genus *Aspergillus* and containing from 1 to 10 proteins were studied for the ability to hydrolyze fibrillar proteins: collagen, keratin, fibrin and elastin. The proteolytic enzymes of *A. alliaceus* 7dN1, *A. clavatus* A16, and *A. ustus* 1 showed an activity comparable to or higher than that of the commercial preparation Terrilitin used in wound therapy. The *A. fumigatus* D1 enzyme preparation also showed high level of fibrinolytic activity.

Keywords: *proteases, fibrillar proteins, collagenases, keratinases, fibrinolytic enzymes, elastases, Aspergillus*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-24-00674. The studies were performed without the use of animals and without involving people as subjects. The authors declare no conflict of interest.

Сведения об авторах

Тиморшина Светлана Наильевна — мл. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: timorshina.svetlana@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2963-4368>

Попова Елизавета Андреевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: e.a.popova1994@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0334-4234>

Галиакберова Аделя Альбертовна — аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: adgaliakberova@gmail.com

Очнева Александра Геннадьевна — инженер-лаборант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aleksochneva@yandex.ru

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.29

Влияние антиоксидантов на продукцию хемокина MCP-1 клетками линии EA.hy926 в ответ на IL-6**М.А. Челомбитко^{*} , И.И. Галкин , О.Ю. Плетюшкина ,
Р.А. Зиновкин , Е.Н. Попова ***Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40**^{*}e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Повышенный уровень интерлейкина-6 (IL-6) в крови является биомаркером цитокинового шторма, вызванного различными заболеваниями, и способствует плохим исходам этих заболеваний, в том числе COVID-19. Одной из основных мишеней патологического действия IL-6 являются эндотелиальные клетки сосудов, которые IL-6 активирует за счет транс-сигнального пути — формирования рецепторного комплекса IL-6/sIL-6Ra/gp130 и последующей индукции сигнального пути JAK/STAT3, а также в ряде случаев PI3K/AKT и MEK/ERK. Ранее было показано, в том числе нами, что активные формы кислорода (АФК), в том числе митохондриального происхождения (мито-АФК), способствуют индукции экспрессии IL-6 в эндотелии главным образом за счет усиления активации транскрипционного фактора NF-kB. Более того, мы показали, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний) предотвращает гибель мышечных, у которых цитокиновый шторм был вызван внутривенным введением фактора некроза опухолей (TNF) в летальной дозе, а также экспрессию NF-kB-зависимых генов, в том числе цитокина IL-6 и хемокина MCP-1 в аортах этих животных. В текущей работе мы проверили гипотезу об участии мито-АФК в передаче сигнала и экспрессии провоспалительных генов в эндотелиальных клетках, активированных IL-6. SkQ1 подавлял индуцированную IL-6 в комбинации с sIL-6Ra экспрессию и секрецию хемокина MCP-1, но не экспрессию молекул адгезии ICAM1 в эндотелиальных клетках человека линии EA.hy926. Используя специфические ингибиторы, мы показали, что в этих клетках вызванная IL-6 экспрессия MCP-1 и ICAM-1 зависит от сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 и в некоторых случаях — от киназ JNK, PI3K и MEK1/2, а также не зависит от киназы p38. В данной модели IL-6 вызывал быструю активацию STAT3 и значительно менее выраженную активацию ERK1/2, но не влиял на активацию Akt и JNK. SkQ1 частично подавлял активацию STAT3 и ERK1/2. Таким образом, мы показали, что SkQ1 подавляет не только NF-kB-зависимую экспрессию IL-6 и других про-воспалительных генов, но и вызванную IL-6 активацию JAK/STAT3 и STAT3-зависимую экспрессию MCP-1. Это, вероятно, вносит вклад в общий противовоспалительный эффект SkQ1.

Ключевые слова: воспаление, цитокиновый шторм, IL-6, эндотелий, митохондрии, антиоксиданты, SkQ1

Интерлейкин-6 (IL-6) — многофункциональный плейотропный цитокин, основным источником которого являются моноциты и макрофаги и который способен секретировать многие другие типы клеток. Постоянное повышение уровня IL-6 сопровождается развитием сердечно-сосудистых, а также хронических воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний [1, 2]. При остром системном воспалении чрезмерная продукция IL-6 является биомаркером цитокинового шторма [3]. Цитокиновый шторм представляет собой чрезмерный несбалансированный иммунный ответ, который может возникать в результате инфицирования патогенными бактериями или вирусами или может иметь неинфекционную природу — например, травмы, ишемии, реакция

«трансплантат против хозяина», аутоиммунные заболевания, последствия инженерной Т-клеточной терапии у пациентов с лейкемией и др. [4]. Во время цитокинового шторма вырабатывается большое количество разнообразных активных медиаторов воспаления, таких как цитокины, хемокины и некоторые факторы роста, что способствует прогрессированию сопутствующих заболеваний [4]. Среди цитокинов, уровень которых повышен у пациентов с плохим прогнозом COVID-19, IL-6 занимает центральное место [5]. Повышенный уровень IL-6 — прогностический фактор тяжелого течения и летального исхода при COVID-19 [6–8].

На сегодняшний день при лечении ряда хронических воспалительных заболеваний применя-

ются как блокада самого IL-6, так и подавление передачи сигналов IL-6R [3]. В настоящее время проводятся многочисленные клинические испытания для оценки эффективности тоцилизумаба (гуманизированные антитела против IL-6R) для терапии осложнений COVID-19, однако результаты этих испытаний весьма противоречивы [9].

Среди мишеней IL-6 особое место занимает эндотелий сосудов, который регулирует проницаемость кровеносных сосудов и миграцию клеток из крови в ткани, а также участвует в регуляции свертывания крови и тонуса сосудов. IL-6 воздействует на эндотелиальные клетки за счет формирования комплекса с растворимой формой рецептора (sIL-6R) и рецепторного гликопротеина 130 (gp130 или CD130), который экспрессируется во всех типах клеток. Рецепторные комплексы с gp130, как правило, активируют сигнальный путь JAK/STAT, но в клетках разных типов могут быть активированы также PI3K/AKT или MEK/ERK [1, 3]. Сообщалось, что IL-6 вызывает усиление проницаемости сосудистого эндотелия [10, 11] и увеличение экспрессии молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина, а также цитокина IL-6 и ряда хемокинов — CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin-1, CCL17/TARC, CCL2/MCP-1 и CXCL8/IL-8, что способствует лейкоцитарной инфильтрации органов [12–16]. Показано также, что IL-6 стимулирует экспрессию PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1; ингибитор активатора плазминогена-1), что способствует усилению коагуляции [17]. Аномальная активация эндотелия приводит к его дисфункции, которая напрямую связана с развитием сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний, а также является частым осложнением цитокиновых штормов [18, 19]. При COVID-19 глубокая эндотелиальная дисфункция и повреждение эндотелия сосудов является основной причиной как острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), так и внелегочных осложнений, таких как острое повреждение миокарда, почечная недостаточность или тромбоэмболические осложнения [20–23].

Активные формы кислорода (АФК), в том числе продуцируемые митохондриями (мито-АФК), играют важную роль в физиологии и патофизиологии сосудистой системы [23–25]. АФК участвуют в продукции IL-6 в ответ на цитокины (TNF, IL-1 β , IL-4), ангиотензин-2, а также в условиях гипоксии [26–30]. Ранее мы показали, что снижение уровня mito-АФК с помощью митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 (10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфоний) приводит к подавлению стимулированной TNF секреции IL-6 и экспрессии ряда провоспалительных генов в культивируемых эндотелиальных клетках, а также экспрессии ряда провоспалительных генов, в т.ч. IL-6, в аортах мышей,

которым вводили TNF в летальных дозах [31, 32]. Более того, SkQ1 предотвращал гибель этих животных [32]. Действие антиоксиданта было в значительной мере связано с подавлением активации транскрипционного фактора NF-kB, который регулирует экспрессию многих провоспалительных генов, в т.ч. IL-6. В то же время сообщалось, что IL-6 сам может вызывать генерацию АФК, что способствует развитию эндотелиальной дисфункции [15, 33]. Однако таких исследований крайне мало, а об участии mito-АФК в трансигнализации IL-6 ничего не известно. В представленной работе мы, используя SkQ1, оценили возможное участие mito-АФК в индуцированной IL-6 экспрессии провоспалительных генов в эндотелиальных клетках.

Материалы и методы

Материалы. SkQ1 был синтезирован Г.А. Коршуновой и Н.В. Сумбатян в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского. В работе использовали реактивы производства Sigma (США) и культуральный пластик производства Costar (США), за исключением случаев, когда указано иное.

Клетки и схема экспериментов. Клетки эндотелия человека линии EA.hy926 (ATCC CRL-2922) растили на среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 100 мкМ гипоксантина и 20 мкМ тимидина (ПанЭко, Россия).

К клеткам, помещенным в 12-луночные планшеты (100 тыс. клеток на лунку), после прикрепления и распластывания добавляли антиоксиданты (100 мкМ Trolox, 20 нм SkQ1). Через 4 сут меняли среду на новую, содержащую 0,2% эмбриональной телячьей сыворотки, и повторно добавляли антиоксиданты. Через 12–15 ч добавляли рекомбинантный человеческий IL-6 (GenScript, США) в смеси с sIL-6Ra (GenScript, США) (концентрации и время воздействия указаны в подписях к рисункам). Ингибиторы STAT-3 (Stattic, 10 мкМ; Apex Bio, США), JNK (SP600125, 20 мкМ; Enzo, США), PI3K (LY294002, 10 мкМ; Cell Signaling, США), MEK1/2 (UO126, 10 мкМ; Cell Signaling, США) и p38 (SB203580, 5 мкМ; Cell Signaling, США) добавляли за 15 мин до смеси IL-6 с sIL-6Ra.

Определение концентрации MCP-1 в ростовой среде. Концентрацию MCP-1 в ростовой среде определяли, используя набор MCP-1-ИФА-БЕСТ (Вектор-БЕСТ, Россия) согласно протоколу производителя.

Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из культивируемых клеток с использованием набора для выделения РНК (Zymo Research; Quick-RNA MiniPrep, США) в соответствии с протоколом производителя. ДНК

разрушали, обрабатывая образцы ДНК-азой (Thermo Fisher Scientific, США), РНК осаждали спиртом, промывали, высушивали и растворяли в воде. Для получения кДНК использовали набор RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси ПЦР-Микс с EVA Green и ROX (Синтол, Россия). Реакцию проводили в амплификаторе iCycler iQ (Bio-Rad, США) в следующих условиях: 95°C 3 мин. → (94°C 15 сек. → 56°C 20 сек. → 72°C 20 сек.) × 40. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода количественного определения $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Значения экспрессии мРНК целевых генов нормировали на значения экспрессии референсного гена *RPL32*. Последовательности праймеров указаны в таблице.

Вестерн-блот. Иммуноблоттинг проводили, как описано ранее [31]. Для визуализации тотального белка в гель включали 0,5% (V/V) 2,2,2-трихлорэтанола [34]. Использовались антитела против следующих белков человека: STAT3 (#CB10245, Cell Applications, США) и фосфо-STAT3 (Tyr705; #MA5-15193; Invitrogen, США), Akt (#2967), фосфо-Akt (Ser473; #4051), ERK1/2 (#4695), фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; #4370), p38 (#4631), фосфо-p38 (Thr180/Tyr182; #9212), SAPK/JNK (#9258), фосфо-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185; #4668S; Cell Signaling, США), а также меченные пероксидазой хрена антитела против иммуноглобулинов кролика или мыши. Для визуализации пероксидазной реакции использовали набор SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Изображения получали с использованием системы ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, США). Анализ полученных изображений проводили с использованием программного обеспечения ImageLab (версия 5.2.1, Bio-Rad, США).

Статистическая обработка. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Группы сравнивали с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (ANOVA, тест множественных сравнений Сидака) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

Результаты

В эндотелиальных клетках человека линии EA.hy926 IL-6 (400 нг/мл) в комбинации с sIL-6Ra (400 нг/мл) заметно стимулировал экспрессию *MCP-1*, *ICAM-1* и *IL-6* (рис. 1, А). Пик экспрессии этих провоспалительных генов наблюдался через час после добавления IL-6 в комбинации с sIL-6Ra. Мы также наблюдали увеличение уровня MCP-1 в ростовой среде клеток EA.hy926 после добавления IL-6 совместно с sIL-6Ra (рис.1, Б). Пик секреции MCP-1 приходился на 8 ч после добавления IL-6 в комбинации с sIL-6Ra.

В клетках EA.hy926 мы не обнаружили роста экспрессии мРНК *PAI-1*, *IL-8* и *RANTES* под действием IL-6 в комбинации с sIL-6Ra (рис. 1, А). Очевидно, это связано с тем, что клетки линии EA.hy926 отчасти утратили эндотелиальные свойства.

Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 и классический антиоксидант Trolox (водорастворимый аналог витамина Е) статистически значимо подавляли повышение содержания MCP-1 в ростовой среде и рост экспрессии мРНК *MCP-1*, вызванные добавлением IL-6 в комбинации с sIL-6Ra (рис. 1, Б и В). Значимого подавления экспрессии *ICAM-1* в этой модели не наблюдалось, что указывает на существование различий в регуляции экспрессии данных генов (рис. 1, Г).

Используя химические ингибиторы, мы оценили вклад сигнальных путей JAK/STAT, PI3K/AKT и MEK/ERK в вызванную IL-6 совместно с sIL-6Ra стимуляцию экспрессии мРНК *MCP-1* и *ICAM-1* в клетках EA.hy926 (рис. 2, А и Б). В наибольшей степени экспрессию *MCP-1* и *ICAM-1* подавлял ингибитор STAT3. Действие ингибиторов JNK, PI3K и MEK1/2 было менее выраженным. Ингибитор p38 экспрессию *MCP-1* и *ICAM-1* не подавлял.

В наших экспериментальных условиях на эндотелиальных клетках линии EA.hy926 IL-6 совместно с sIL-6Ra вызывал быструю и выраженную активацию STAT3 (фосфорилирование Tyr705), менее заметную активацию ERK1/2 (фосфорилирование Thr202/Tyr204), но не влиял на активацию Akt-1 (фосфорилирование Ser473) и SAPK/JNK (фосфорилирование Thr183/Tyr185)

Таблица

Последовательности использованных праймеров для количественной ПЦР

Целевой ген	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>hIL-6</i>	GACAACTCATCTCATTTCTG	CCATTAACAACAACAATCTG
<i>hIL-8</i>	CAGTGAAGATGCCAGTGAA	TTAACCAGGAATCTTGTATTGC
<i>hICAM-1</i>	TGTCATCATCACTGTGGTAGC	CTTGTGTGTTCGGTTTCATGG
<i>hPAI</i>	CACATTGCCATCACTCTTG	CATTCACCTCTGCCACCTG
<i>hCCL2 (hMCP-1)</i>	CAGAAAGTGGGTTTCAGGATT	ATTCTTGGGTTGTGGAGTG
<i>hCCL5 (hRANTES)</i>	AAGAAATGGGTTCCGGGAGTA	TAGGACAAGAGCAAGCAGAA
<i>hRPL32</i>	CATCTCCTTCTCGGCATCA	AACCCTGTTGTCAATGCCTC

(рис. 2, В и Г). SkQ1 частично подавлял фосфорилирование STAT3 и в меньшей степени – ERK1/2 (рис 2, В и Г). Таким образом, мито-АФК усиливают экспрессию мРНК *MCP-1* в значительной степени за счет усиления активации STAT3.

Обсуждение

IL-6 – важный медиатор воспаления, повышенный уровень которого ассоциирован с сердечно-сосудистыми и хроническими воспалительными заболеваниями, а также цитокиновыми штормами разной этиологии и их плохими исходами [2, 3]. АФК, в том числе мито-АФК, повышают экспрессию IL-6, что способствует усилению воспаления и развитию патологий [26–30]. Есть также немногочисленные сообщения об участии АФК в передаче воспалительных сигналов от рецепторного комплекса IL-6-sIL-6Ra-gp130 [15, 33]. Показано, что IL-6 способен индуцировать окислительный стресс в культивируемых гладкомышечных клетках сосудов и сосудах мышей за счет

стимуляции экспрессии рецептора 1-го типа ангиотензина II [33]. Сообщалось также, что ресвератрол (полифенол красного вина, обладающий антиоксидантными свойствами) подавляет индуцированные IL-6 Rac1-зависимую генерацию АФК и экспрессию *ICAM-1* в эндотелии [15]. Мы показали, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 и классический антиоксидант Trolox в одинаковой степени подавляют вызванные IL-6 в комбинации с sIL-6-R1 экспрессию мРНК и секрецию белка MCP-1 (рис. 1, Б и В), что свидетельствует об участии мито-АФК в передаче воспалительного сигнала от рецепторного комплекса IL-6-sIL-6Ra-gp130 в эндотелиальных клетках.

Используя химические ингибиторы, мы показали, что в клетках EA.hy926 стимулированная IL-6 в комбинации с sIL-6Ra экспрессия *MCP-1* зависит от STAT3 и в меньшей степени – от PI3K и MEK1/2, а также от JNK, но не от p38 (рис. 2, А), что соответствовало данным, полученным на других культурах эндотелия [1, 3]. В эндотелиальных клетках линии

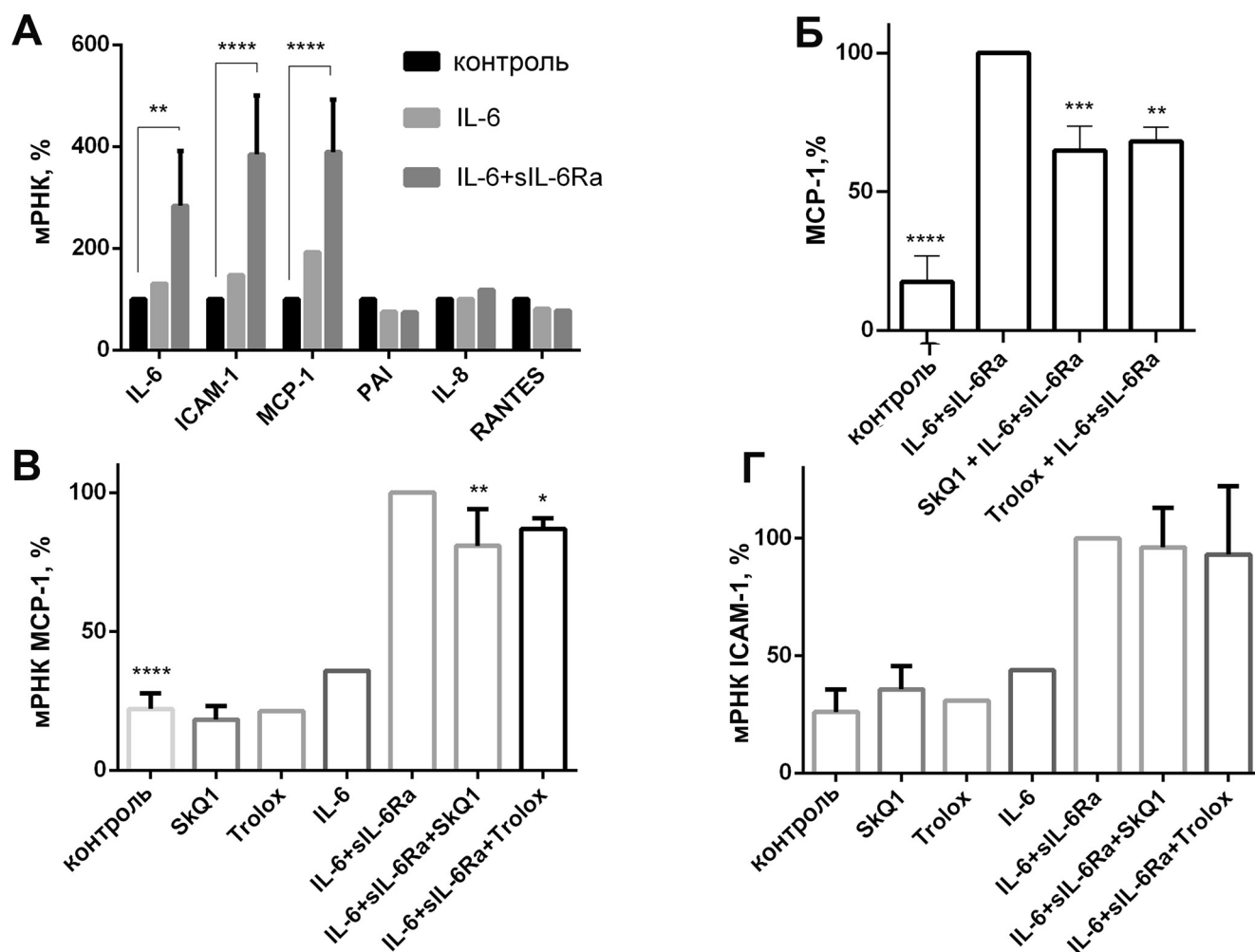


Рис. 1. Антиоксиданты SkQ1 и Trolox подавляют вызванные IL-6 экспрессию мРНК *MCP-1* и секрецию этого хемокина. Клетки обрабатывали антиоксидантами SkQ1 (20 нМ) и Trolox (100 мкМ), через 4 сут добавляли смесь IL-6 с sIL-6Ra (по 400 нг/мл). Экспрессию мРНК провоспалительных генов определяли через 1 ч, секрецию MCP-1 – через 8 ч после добавления смеси IL-6 с sIL-6Ra. А – Влияние IL-6 на экспрессию мРНК провоспалительных генов клетках EA.hy926. Б–Г – Влияние антиоксидантов SkQ1 (20 нМ, 4 сут) и Trolox (100 мкМ, 4 сут) на вызванные IL-6 секрецию MCP-1 (Б) и экспрессию мРНК *MCP-1* (В) и мРНК *ICAM-1* (Г). N ≥ 4, * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001, **** – p < 0,0001 по сравнению с обработанными только IL-6 с sIL-6Ra клетками.

EA.hy926 IL-6 совместно с sIL-6Ra вызывал быструю и выраженную активацию STAT3 и небольшую активацию ERK1/2, но не влиял на активацию Akt-1 и JNK (рис. 2, В). Мы также показали, что SkQ1 подавляет активацию STAT3 и в меньшей степени — ERK1/2 (рис. 2, В и Г). Таким образом, в используемой модели механизм противовоспалительного действия SkQ1 в значительной степени был связан с подавлением активации STAT3.

Ранее на эндотелии из бычьих аорт было показано, что ресвератрол подавляет индуцированную IL-6 экспрессию *ICAM-1* за счет предотвращения фосфорилирования STAT3 [15]. Анализ с использованием химических ингибиторов выявил одни и те же основные регуляторы экспрессии для

MCP-1 и *ICAM-1* в нашей модели (рис. 2, А и Б). Однако, к нашему удивлению, ни Trolox, ни SkQ1 не повлияли на вызванную IL-6 экспрессию мРНК *ICAM-1* в клетках EA.hy926 (рис. 1, Г). Это указывает на существование различий в редокс-регуляции экспрессии этих генов у разных видов.

Антиоксиданты, в том числе митохондриально-направленные, проявляли выраженный терапевтический эффект в некоторых моделях сепсиса и синдрома системного воспалительного ответа у животных [32, 35, 36]. Однако в модели сепсиса, вызванного перевязкой и пункцией слепой кишки у мышей, антиоксиданты SkQ1 и mito-Tempo оказались неэффективны [37]. Ранее мы показали, что SkQ1 предотвращает падение температуры тела

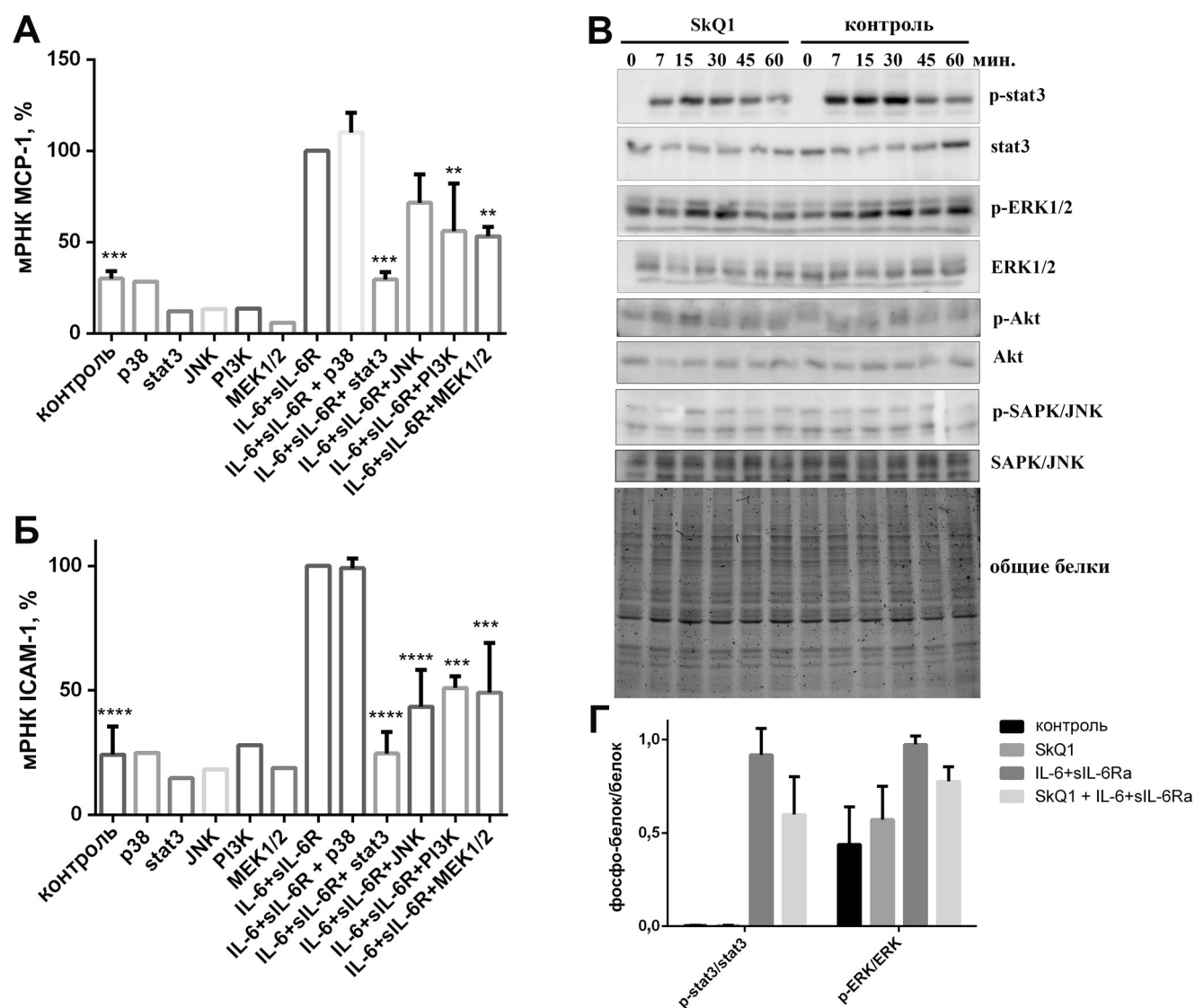


Рис. 2. Снижение экспрессии мРНК *MCP-1* под действием антиоксиданта SkQ1 по крайней мере отчасти связано с его способностью подавлять активацию STAT3. Клетки обрабатывали антиоксидантами и смесью IL-6 с sIL-6Ra, как указано в подписи к рис. 1. Ингибиторы добавляли за 15 мин до смеси IL-6 с sIL-6Ra. Образцы для ПЦР собирали через 1 ч, для вестерн-блотов — через 7–60 мин после добавления смеси IL-6 с sIL-6Ra. **А, Б** — Влияние ингибиторов STAT-3 (static, 10 мкМ), JNK (SP600125, 20мкМ), PI3K (LY294002, 10мкМ), MEK1/2 (UO126, 10мкМ) и p38 (SB203580, 5мкМ) на индуцированную IL-6 с sIL-6Ra экспрессию мРНК *MCP-1* (**А**) и *ICAM-1* (**Б**). **В, Г** — Влияние SkQ1 (20 нМ, 4 сут) и Trolox (100 мкМ, 4 сут) на активацию (фосфорилирование) STAT3, ERK1/2, Akt и SAPK/JNK под действием IL-6 с sIL-6Ra (7–60 мин). **В** — Изображения типичных вестерн-блотов; **Г** — денситометрический анализ вестерн-блотов. N ≥ 3, * — p ≤ 0,05, ** — p ≤ 0,01, *** — p ≤ 0,001, **** — p ≤ 0,0001 по сравнению обработанными только IL-6 с sIL-6Ra клетками.

и гибель мышей, которым вводили TNF в летальных дозах, и подавляет экспрессию регулируемых NF- κ B генов (*VCAM-1*, *ICAM-1*, *MCP-1* и *IL-6*) в аортах этих мышей [32]. В эндотелиальных клетках *in vitro* SkQ1 подавлял стимулированную TNF активацию транскрипционного фактора NF- κ B и, как следствие, NF- κ B-зависимую экспрессию *ICAM-1*, *VCAM-1*, *E-селектина*, *MMP-9*, а также секрецию IL-6 и IL-8 [31,32]. С использованием трансгенных мышей было показано, что подавление активации транскрипционного фактора NF- κ B в эндотелии предотвращает эндотелиальную дисфункцию в моделях сепсиса, вызванного липополисахаридаом или с помощью перевязки и пункции слепой кишки [38]. Однако терапевтический эффект SkQ1, по-видимому, не ограничивается подавлением активации NF- κ B. SkQ1 оказывает комплексное ангиопротекторное действие на эндотелий сосудов: он подавляет вызванные TNF адгезию клеток человеческого промиелоцитарного лейкоза линии HL-60 к эндотелию [31], разборку межклеточных контактов и увеличение проницаемости эндотелиального барьера [32, 39, 40], а также апоптоз эндотелиальных клеток [41]. В первых двух случаях действие SkQ1 было в значительной мере связано с предотвращением активации NF- κ B, в то время как подавление апоптоза и каспазо-

зависимого разрушения межклеточных контактов и эндотелиальной проницаемости было связано с предотвращением выхода из митохондрий цитохрома-с. Кроме того, SkQ1 ингибировал дегрануляцию тучных клеток *in vivo* и *in vitro*, что также могло способствовать снижению активации эндотелия при остром воспалении [42, 43]. Сейчас мы дополнили эту картину данными о том, что SkQ1 подавляет не только NF- κ B-зависимую экспрессию и секрецию IL-6, но и вызванную IL-6 активацию JAK/STAT3 и, как следствие, экспрессию *MCP-1*, что, вероятно, вносит вклад в общий терапевтический эффект SkQ1.

Ограничения исследования

Работа выполнена на клеточной линии EA.hy926, представляющей собой гибридную первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и аденокарциномы легочной ткани человека линии A549.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60452). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uciechowski P., Dempke W.C.M. Interleukin-6: A masterplayer in the cytokine network // *Oncology*. 2020. Vol. 98. N 3. P. 131–137.
2. Hou T., Tieu B.C., Ray S., Recinos III A., Cui R., Tilton R.G., Brasier A.R. Roles of IL-6-gp130 signaling in vascular inflammation // *Curr. Cardiol. Rev.* 2008. Vol. 4. N 3. P. 179–192.
3. Kang S., Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms // *Exp. Mol. Med.* 2021. Vol. 53. N 7. P. 1116–1123.
4. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine storm // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383. N 23. P. 2255–2273.
5. Liu Y., Chen D., Hou J., Li H., Cao D., Guo M., Ling Y., Gao M., Zhou Y., Wan Y., Zhu Z. An inter-correlated cytokine network identified at the center of cytokine storm predicted COVID-19 prognosis // *Cytokine*. 2021. Vol. 138: 155365.
6. Chen G., Wu D.I., Guo W., et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 // *J. Clin. Invest.* 2020. Vol. 130. N 5. P. 2620–2629.
7. Herold T., Jurinovic V., Arnreich C., Lipworth B.J., Hellmuth J.C., von Bergwelt-Baildon M., Klein M., Weinberger T. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19 // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020. Vol. 146. N 1. P. 128–136.e4.
8. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China // *Intensive Care Med.* 2020. Vol. 46. N 5. P. 846–848.
9. Ascierto P.A., Fu B., Wei H. IL-6 modulation for COVID-19: the right patients at the right time? // *J. Immunother. Cancer*. 2021. Vol. 9. N 4: e002285.
10. Alsaffar H., Martino N., Garrett J.P., Adam A.P. Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via Janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018. Vol. 314. N 5. P. C589–C602.
11. Desai T.R., Leeper N.J., Hynes K.L., Gewertz B.L. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway // *J. Surg. Res.* 2002. Vol. 104. N 2. P. 118–123.
12. Watson C., Whittaker S., Smith N., Vora A.J., Dumonde D.C., Brown K.A. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes // *Clin. Exp. Immunol.* 1996. Vol. 105. N 1. P. 112–119.
13. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., Van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment // *Immunity*. 1997. Vol. 6. N 3. P. 315–325.
14. Wung B.S., Ni C.W., Wang D.L. ICAM-1 induction by TNF α and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells // *J. Biomed. Sci.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 91–101.
15. Wung B.S., Hsu M.C., Wu C.C., Hsieh C.W. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: Effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation // *Life Sci.* 2005. Vol. 78. N 4. P. 389–397.
16. McLoughlin R.M., Jenkins B.J., Grail D., Williams A.S., Fielding C.A., Parker C.R., Ernst M., Topley N., Jones S.A. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102. N 27. P. 9589–9594.

17. Kang S., Tanaka T., Inoue H., Ono C., Hashimoto S., Kioi Y., Matsumoto H., Matsuura H., Matsubara T., Shimizu K., Ogura H. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. Vol. 117. N 36. P. 22351–22356.
18. Xu S., Ilyas I., Little P.J., Li H., Kamato D., Zheng X., Luo S., Li Z., Liu P., Han J., Harding I.C. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies // *Pharmacol. Rev.* 2021. Vol. 73. N 3. P. 924–967.
19. Aird W.C. Review article The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Blood*. 2003. Vol. 101. N 10. P. 3765–3777.
20. Prasad M., Leon M., Lerman L.O., Lerman A. Viral endothelial dysfunction: A unifying mechanism for COVID-19 // *Mayo Clin. Proc.* 2021. Vol. 96. N 12. P. 3099–3108.
21. Jin Y., Ji W., Yang H., Chen S., Zhang W., Duan G. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020. Vol. 5: 293.
22. Birnhuber A., Fliesser E., Gorkiewicz G., Zacharias M., Seeliger B., David S., Welte T., Schmidt J., Olschewski H., Wygrecka M., Kwapiszewska G. Between inflammation and thrombosis: Endothelial cells in COVID-19 // *Eur. Respir. J.* 2021. Vol. 58. N 3: 2100377.
23. Otifi H.M., Adiga B.K. Endothelial dysfunction in Covid-19 infection // *Am. J. Med. Sci.* 2022. Vol. 363. N 4. P. 285–291.
24. Panieri E., Santoro M.M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72. N 17. P. 3281–3303.
25. Aldosari S., Awad M., Harrington E.O., Sellke F.W., Abid M.R. Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology // *Antioxidants*. 2018. Vol. 7. N 1: 14.
26. Didion S.P. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 12: 2563.
27. Volk T., Hensel M., Schuster H., Kox W.J. Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells // *Mol. Cell. Biochem.* 2000. Vol. 206. N 1–2. P. 105–112.
28. Ali M.H., Schlidt S.A., Chandel N.S., Hynes K.L., Schumacker P.T., Gewertz B.L. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. // *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* 1999. Vol. 277. Pt. 1. P. L1057–L1065.
29. Lee Y.W., Lee W.H., Kim P.H. Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium // *Cytokine*. 2010. Vol. 49. N 1. P. 73–79.
30. Pearlstein D.P., Ali M.H., Mungai P.T., Hynes K.L., Gewertz B.L., Schumacker P.T. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. Vol. 22. N 4. P. 566–573.
31. Zinovkin R.A., Romashchenko V.P., Galkin I.I., Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V., Popova E.N. Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium // *Aging (Albany N.Y.)*. 2014. Vol. 6. N 8. P. 661–674.
32. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Galkin I.I., Zinovkin R.A., Chernyak B.V., Krysko D.V., Bachert C., Krysko O., Skulachev V.P., Popova E.N. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 2017. Vol. 1863. N 4. P. 968–977.
33. Wassmann S., Stumpf M., Strehlow K., Schmid A., Schieffer B., Böhm M., Nickenig G. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor // *Circ. Res.* 2004. Vol. 94. N 4. P. 534–541.
34. Chopra A., Willmore W.G., Biggar K.K. Protein quantification and visualization via ultraviolet-dependent labeling with 2,2,2-trichloroethanol // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9: 13923.
35. Li R., Ren T., Zeng J. Mitochondrial coenzyme Q protects sepsis-induced acute lung injury by activating PI3K/Akt/GSK-3 β /mTOR pathway in rats // *Biomed Res. Int.* 2019. Vol. 2019: 5240898.
36. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Popova E.N., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidants and uncouplers of oxidative phosphorylation in treatment of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) // *J. Cell. Physiol.* 2017. Vol. 232. N 5. P. 904–912.
37. Rademann P., Weidinger A., Drechsler S., et al. Mitochondria-targeted antioxidants SkQ1 and MitoTEMPO failed to exert a long-term beneficial effect in murine polymicrobial sepsis // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. Vol. 2017: 6412682.
38. Ding J., Song D., Ye X., Liu S.F. A pivotal role of endothelial-specific NF- κ B signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. N 6. P. 4031–4038.
39. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Manskikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice // *Aging (Albany N.Y.)*. 2015. Vol. 7. N 7. P. 475–485.
40. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 reduces TNF-induced endothelial permeability in vitro // *Biochemistry (Mosc.)*. 2016. Vol. 81. N 10. P. 1188–1197.
41. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Birjukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF α -induced endothelial cell damage // *Biochemistry (Mosc.)*. 2014. Vol. 79. N 2. P. 124–130.
42. Chelombitko M.A., Averina O.A., Vasilyeva T.V., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Fedorov A.V., Chernyak B.V., Shishkina V.S., Ilinskaya O.P. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 (10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium bromide) inhibits mast cell degranulation in vivo and in vitro // *Biochemistry (Mosc.)*. 2017. Vol. 82. N 12. P. 1493–1503.
43. Chelombitko M.A., Averina O.A., Vasil'eva T.V., Dvorianinova E.E., Egorov M.V., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Fedorov A.V., Romashchenko V.P., Ilyinskaya O.P. Comparison of the effects of mitochondria-targeted antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium bromide (SkQ1) and a fragment of its molecule dodecyltriphenylphosphonium on carrageenan-induced acute inflammation in mouse model of subcutaneo // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. Vol. 162. N 6. P. 730–733.

Поступила в редакцию 21.06.2022

После доработки 25.07.2022

Принята в печать 26.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Effect of antioxidants on the production of MCP-1 chemokine by EA.hy926 cells in response to IL-6

M.A. Chelombitko^{*} , I.I. Galkin , O.Yu. Pletjushkina ,
R.A. Zinovkin , E.N. Popova 

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–40 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia*

^{*}*e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Elevated level of circulatory interleukin 6 (IL-6) is a biomarker for cytokine storm of various etiologies including COVID-19 and contributes to poor prognosis. Vascular endothelial cells are one of the main targets of pathological action of IL-6. IL-6 activates trans-signaling pathway via the formation of the IL-6/sIL-6Ra/gp130 receptor complex and subsequent activation of the JAK/STAT3 signaling pathway, and in some cases PI3K/AKT and MEK/ERK kinases. Previously, by our group and other researchers, it was shown that reactive oxygen species (ROS) including mitochondrial ROS (mito-ROS) contribute to the induction of IL-6 expression in the endothelium, mainly due to increased activation of the transcription factor NF-κB. We have also shown that the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 (plastoquinolyl-10(6'-decyltriphenyl) phosphonium) prevented tumor necrosis factor (TNF)-induced cytokine storm and death in mice. In the aortas of these animals, SkQ1 also prevented the increase in the expression of NF-κB-dependent genes, including the cytokine IL-6 and the chemokine MCP-1. In the current work, we have tested the hypothesis of mito-ROS involvement in the IL-6-signaling-mediated pro-inflammatory gene expression in endothelial cells. SkQ1 suppressed the expression and secretion of the MCP-1 chemokine, induced by IL-6 in combination with sIL-6-Ra, but not the expression of ICAM1 adhesion molecules in EA.hy926 human endothelial cells. Using specific inhibitors, we have shown that in EA.hy926 cells, IL-6-induced expression of MCP-1 and ICAM-1 depends on the signaling protein and transcription activator STAT3 and, in some cases, on JNK, PI3K, and MEK1/2 kinases and is independent of p38 kinase. In this model, IL-6 induced rapid STAT3 activation while ERK1/2 activation was less pronounced, and there was no IL-6 effect on Akt and JNK activation. SkQ1 partially suppressed STAT3 and ERK1/2 activation. Thus, we have shown that SkQ1 suppresses not only NF-κB-dependent expression of IL-6 and other pro-inflammatory genes, but also IL-6-induced activation of JAK/STAT3 and STAT3-dependent expression of MCP-1, which probably contributes to the overall therapeutic effect of SkQ1.

Keywords: *inflammation, cytokine storm, IL-6, endothelium, mitochondria, antioxidant, SkQ1*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-60452.

Сведения об авторах

Челомбитко Мария Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3902-7812>

Галкин Иван Ильич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: ddeathseller@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9025-3794>

Плетюшкина Ольга Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: pletjush@genebee.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4963-9054>

Зиновкин Роман Алексеевич — канд. биол. наук, зав. лабораторией электронного транспорта отдела молекулярной энергетики микроорганизмов НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: roman.zinovkin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5337-4346>

Попова Екатерина Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: k_porova_ch@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7521-7736>

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

литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке: «Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹*Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

²*Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia*

**e-mail: kolosova@mail.ru*

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и приставленного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **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](#)