

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 79 • № 3 • 2024 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

- Фрайкин Г.Я. Фотосенсибилизированные реакции окислительного повреждения биомолекул: роль в генотоксических и цитотоксических процессах 167

Оригинальные исследования

- Чумасов Е.И., Петрова Е.С., Коржевский Д.Э. Морфологические особенности иннервации органов средостения крысы в разные сроки постнатального онтогенеза 184
- Кривина Е.С., Синетова М.А., Редькина В.В., Соромотин А.В., Жеребятьева Н.В., Темралеева А.Д. Новые штаммы рода *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): состав жирных кислот и их возможное использование в качестве биодобавок для животных и человека 193
- Кореневский А.В., Милютин Ю.П., Бочковский С.К., Соколов Д.И., Сельков С.А., Беспалова О.Н. Влияние фракций клеточного лизата естественных киллеров на пролиферацию клеток трофобласта в системе *in vitro* 202
- Павлюченкова А.Н., Воробьева Н.В., Дашкевич А.А., Зиновкина Л.А., Иванеев А.И., Ермолин М.С., Федотов П.С., Зиновкин Р.А., Челомбитко М.А., Черняк Б.В. Наночастицы городской пыли вызывают провоспалительную активацию нейтрофилов и макрофагов 211
- Моцарь Е.В., Шевелева А.А., Шарко Ф.С., Митрофанова И.В., Чирков С.Н. Секвенирование и анализ полного генома российского изолята вируса А черешни (cherry virus A). 221
- Пьянкова Е.В., Максимова Ю.Г. Влияние производных графена на биопленкообразование *Candida maltose* 227
- Булавин И.В., Корзина Н.В., Мирошниченко Н.Н., Саплев Н.М., Солдатов Д.К., Шевчук О.М. Клональное микроразмножение розы эфиромасличной сорта «Фестивальная»: морфология, структура и плоидность микропобегов. 235

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 79 • No. 3 • 2024 • JULY — SEPTEMBER

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Reviews

- Fraikin G. Ya. Photosensitized reactions of oxidative damage to biomolecules:
role in genotoxic and cytotoxic processes 167

Research articles

- Chumasov E.I., Petrova E.S., Korzhevskii D.E. Morphological features
of rat mediastinum organs innervation at different stages of postnatal ontogenesis. . . . 184
- Krivina E.S., Sinetova M.A., Red'kina V.V., Soromotin A.V.,
Zheryatyeva N.V., Temraleeva A.D. New strains of the genus *Vischeria*
(Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): composition of fatty acids
and their possible use as dietary supplements for animals and humans 193
- Korenevsky A.V., Milyutina Yu.P., Bochkovsky S.K., Sokolov D.I.,
Selkov S.A., Beshpalova O.N. Natural killer cell lysate fractions affect trophoblast
cell proliferation *in vitro* 202
- Pavlyuchenkova A.N., Vorobyeva N.V., Dashkevich A.A., Zinovkina L.A.,
Ivaneev A.I., Ermolin M.S., Fedotov P.S., Zinovkin R.A.,
Chelombitko M.A., Chernyak B.V. Urban dust nanoparticles induce
proinflammatory activation of neutrophils and macrophages 211
- Motsar E.V., Sheveleva A.A., Sharko F.S., Mitrofanova I.V., Chirkov S.N.
Sequencing and analysis of the complete genome of the Russian cherry virus A isolate . . 221
- Pyankova E.V., Maksimova Yu.G. Effect of graphene derivatives on biofilm
formation by *Candida maltose* 227
- Bulavin I.V., Korzina N.V., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M.,
Soldatov D.K., Shevchuk O.M. Clonal micropropagation of the essential oil rose
cultivar "Festivalnaya": morphology, anatomy and microshoots' ploidy level 235

ОБЗОР

УДК 577.344.2



Фотосенсибилизированные реакции окислительного повреждения биомолекул: роль в генотоксических и цитотоксических процессах

Г.Я. Фрайкин

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

Фотосенсибилизированные реакции окисления биомолекул, таких как липиды, белки и ДНК, инициируют цитотоксические и генотоксические процессы, которые опосредуются эндогенными сенсибилизаторами при действии на живые системы ультрафиолетового излучения А-области (УФА, 320–400 нм). Фотосенсибилизированные окислительные реакции зависят от кислорода, и по первичному механизму их разделяют на тип I и тип II. Реакции типа I вовлекают перенос электрона между фотовозбужденным сенсибилизатором и биомолекулой с формированием радикальных состояний. При взаимодействии катион-радикала биомолекулы с кислородом (O_2) образуются конечные продукты ее окисления, а перенос электрона между анион-радикалом сенсибилизатора и O_2 генерирует супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$) с последующим образованием H_2O_2 и гидроксильного радикала ($\bullet OH$), обладающего высокой реакционной активностью. В отличие от радикального механизма реакций типа I, первичный механизм реакций типа II вовлекает перенос энергии от фотовозбужденного сенсибилизатора к O_2 , что приводит к формированию синглетного кислорода (1O_2 , $^1\Delta_g$), который намного более реакционноспособен в отношении окисления биомолекул, чем O_2 . Современные представления о механизмах начальных стадий реакций типа I и типа II и их вовлечения в окислительную деградацию ДНК, белков и липидов подробно изложены в настоящем обзоре. Также рассмотрены сенсибилизирующие свойства птеринов, рибофлавина и протопорфирина IX с характерными особенностями действия каждого из этих фотосенсибилизаторов. Значительное внимание уделено процессам сенсибилизированного повреждения ДНК и обсуждению роли различных фотопродуктов ДНК в инициации генотоксических процессов, включая канцерогенез в коже человека.

Ключевые слова: фотосенсибилизированные реакции, окислительная деградация биомолекул, фотопродукты ДНК, генотоксические процессы, клеточные фотосенсибилизаторы, фотоны УФА

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-1

Принятые сокращения:

6-4PP (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproduct) – пиримидин 6-4 пиримидоновый фотопродукт;

8-oxodG (8-oxo-dihydroguanine) – 8-оксодигидрогуанин;

ARE – антиоксидант-реагирующий элемент (antioxidant response element)

Bip (biopterin) – биоптерин;

Cap (6-carboxypterin) – 6-карбоксиптерин;

CPD (cyclobutane pyrimidine dimer) – циклобутановый пиримидиновый димер;

For (6-formylpterin) – 6-формилптерин;

H_4Bip (5,6,7,8-tetrahydrobiopterin) – 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин;

Nep (neopterin) – неоптерин;

NER (nucleotide excision repair) – эксцизионная репарация нуклеотидов;

Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2) – ядерный фактор эритроидного происхождения 2;

Ptr (pterin) – птерин;

ХРС (xeroderma pigmentosum complementation group C) – пигментная ксеродерма группы C;

АФК – активные формы кислорода;

МДА – малоновый диальдегид;

НЖК – ненасыщенные жирные кислоты;

ПФОЛ – перекисного фотоокисления липидов;

УФА/УФВ – ультрафиолет А-области (320–400 нм)/ультрафиолет В-области (290–320 нм).

Введение

Ультрафиолетовое излучение (УФ-излучение) солнца индуцирует в биомолекулах клеточных структур фотохимические деструктивные реакции, которые могут приводить к развитию цитотоксических эффектов, мутагенеза и канцерогенеза. УФ-излучение В-области (УФВ, 290–320 нм) вызывает повреждения в молекулах ДНК и белков за счет прямого поглощения фотонов. УФ-излучение А-области (УФА, 320–400 нм) индуцирует формирование дефектов в ДНК, а также в белках и липидах мембран преимущественно путем инициации фотосенсибилизированных окислительных реакций, известных как фотодинамические реакции. В таких реакциях фотовозбужденный сенсибилизатор может либо взаимодействовать с молекулой биосубстрата, иницируя перенос электрона с образованием радикальных интермедиатов, реагирующих затем с O_2 , либо вначале передавать энергию к O_2 , переводя его в синглетную возбужденную форму 1O_2 ($^1\Delta_g$), которая является сильным окислителем. В конечном итоге эти процессы приводят к окислительному повреждению ДНК, белков и липидов [1].

Из двух видов солнечного УФ-излучения, проникающего в биосферу, более сильное повреждающее действие на живые системы оказывают высокоэнергетичные фотоны УФВ. Их значение с точки зрения риска индукции канцерогенеза в коже человека и клеточной смерти у растений возрастает в связи с повышением уровня излучения УФВ в биосфере вследствие расщепления стратосферного озона [2, 3]. ДНК — одна из критических молекулярных мишеней в клеточных структурах при действии УФВ. Основными хромофорами ДНК являются азотистые основания; при этом квантовые выходы фотохимических реакций пиримидиновых оснований на порядок выше, чем пуриновых. Поглощение фотонов основаниями ДНК приводит к образованию их электронно-возбужденных синглетных и триплетных состояний. В исследованиях последнего времени с применением фемтосекундной спектроскопии изучены процессы релаксации возбужденных состояний оснований, предшествующие фотохимическим реакциям. Применявшиеся ранее для объяснения УФ-индуцированной реакционной активности ДНК термины «синглет» или «триплет» детализировались несколькими возбужденными состояниями, такими как $\pi\pi^*$, $\pi\pi^*$, $\sigma\pi^*$ и экситоны, заселяемые непосредственно при поглощении фотона, а далее они переходят в бирадикальные состояния и состояния с переносом заряда. Показано также, что при фотовозбуждении между основаниями в ДНК имеет место перенос заряда и энергии [4].

Фотоны УФВ индуцируют в ДНК образование двух главных типов фотопродуктов — циклобутановых пиримидиновых димеров (cyclobutane

pyrimidine dimers, CPDs) и пиримидин (6-4) пиримидиновых фотопродуктов (pyrimidine 6-4 pyrimidine photoproducts, 6-4PPs) [2, 5]. Оба типа дефектов формируются соседними основаниями пиримидинов в одной цепи ДНК. В CPD циклобутановое кольцо формируется за 1 пс вследствие разрыва 5–6-двойных связей оснований и образования между пиримидинами двух ковалентных связей. В 6-4PP формируется сложная химическая структура, где атомы кислорода и водорода одного основания перенесены к другому основанию и между ними образована одинарная ковалентная связь. Формированию одинарной связи предшествует стадия циклизации между связью C5–C6 пиримидина и C4 карбонильной группы тимина или иминогруппы цитозина, а далее образующиеся нестабильные продукты циклизации реорганизуются в 6-4PP. Сложный механизм процесса формирования 6-4PP требует более длительного времени (4 мс) для его завершения, и квантовый выход 6-4PP ($\Phi \approx 3 \cdot 10^{-3}$) примерно в семь раз меньше квантового выхода CPD ($\Phi \approx 2 \cdot 10^{-2}$). Кроме того, 6-4PP, в отличие от CPD, поглощает фотоны в области УФА (320 нм), что вызывает переход 6-4PP при воздействии УФА в Dewar-изомер в быстрой (130 пс) реакции циклизации между N3 и C6 в структуре пиримидинового кольца 6-4PP [5]. Биологические эффекты УФВ (цитотоксичность, мутагенез, канцерогенез) связаны в основном с образованием в ДНК CPDs, на долю которых приходится до 80% всех повреждений, остальные (около 20%) составляют 6-4PPs. Биологическая эффективность реакций повреждения клеточной ДНК при действии УФА на 2–4 порядка ниже, чем при облучении УФВ. Вместе с тем интенсивность УФА в биосфере в 20 раз выше интенсивности УФВ, и поэтому фотоны УФА тоже вносят вклад в генотоксические и цитотоксические процессы — в основном с участием фотосенсибилизаторов [5, 6].

К настоящему времени установлено, что оба компонента УФ-излучения солнца (УФВ и УФА) вовлекаются в этиологию основных типов рака кожи человека. К ним относятся базальная клеточная карцинома и меланома; они происходят из кератиноцитов и меланоцитов соответственно. В ранних исследованиях была выявлена причинная связь между облучением УФВ и немеланомными типами рака кожи с характерными мутационными признаками, такими как транзиции C→T в дипиримидиновых сайтах ДНК и CC→TT-танDEMные замены оснований в генах p53. Эти мутации вызваны главным образом CPDs, которые репарируются в клетках системой эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) медленнее, чем 6-4PPs [2]. Более быстрая репарация 6-4PPs обусловлена тем, что 6-4PPs сильнее нарушают структуру спирали ДНК и поэтому эффективнее опознаются и устраняются

NER [7]. Выяснению роли УФА в процессах канцерогенеза способствовали эпидемиологические исследования. Были получены свидетельства того, что долгосрочные и повторяющиеся облучения искусственным УФА от ламповых источников для загара представляют большой фактор риска индукции меланомы у людей. Также повышенный риск возникновения меланомы наблюдался у пациентов при фотохимической терапии псориаза, включающей комбинированное действие сенсibilизатора псоралена и УФА. Таким образом, стало ясно, что УФА не является фотохимически/биологически неактивным и индуцирует сенсibilизированную генерацию активных форм кислорода (АФК), которые, как показано, вовлекаются в канцерогенез в коже человека [5].

УФА намного эффективнее УФВ в окислительном повреждении оснований ДНК в изолированных клетках и коже человека [5]. Индуцированное УФА формирование 8-оксодигидрогуанина (8-oxo-dihydroguanine, 8-oxodG) обусловлено в основном селективным окислением гуанина синглетным кислородом ($^1\text{O}_2$), генерируемым посредством механизма фотосенсибилизации типа II. Меньший вклад в формирование 8-oxodG вносит гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$), который может образовываться после начальной сенсibilизированной генерации супероксидного анион-радикала кислорода ($\text{O}_2^{\cdot-}$) по механизму фотосенсибилизации типа I. Следует отметить, что 8-oxodG в ДНК является наиболее часто образующимся продуктом модификации азотистых оснований и одним из ключевых биомаркеров окислительного повреждения нуклеиновых кислот, опосредованных генерацией АФК. Повышение уровней содержания 8-oxodG и его аналогов наблюдается при многих патологических состояниях и воздействиях на живые системы экзогенных факторов. Помимо 8-oxodG — главного продукта фотоокислительных реакций в ДНК — УФА вызывает образование окисленных пиримидинов и одноцепочечных разрывов, а также независимое от O_2 формирование CPDs, содержащих преимущественно основания тимина [1]. Эти CPDs формируются путем триплет-триплетного переноса энергии от эндогенных фотосенсибилизаторов к основаниям тимина ДНК [8, 9]. В соответствии с таким сложным спектром повреждений спектры мутаций, индуцированных УФА в клеточной ДНК, представлены транзигциями G→A, обусловленными, по-видимому, CPDs, и трансверсиями G→T, вызванными, вероятно, 8-oxodG [2]. Трансверсии возникают в процессе репликации в результате спаривания окисленного гуанина не с цитозином, а с аденином. В следующем цикле репликации напротив аденина располагается тимин, что приводит к замене гуанина на тимин в нуклеотидной цепи.

В настоящем обзоре изложены современные представления о молекулярных механизмах фор-

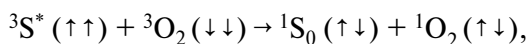
мирования дефектов в ДНК, а также в белках и липидах посредством фотосенсибилизированных окислительных реакций типа I и типа II. Особое внимание уделено процессам окислительного повреждения ДНК, которые инициируются АФК, генерируемыми эндогенными фотосенсибилизаторами, такими как птерины, рибофлавин, протопорфирин IX. Проанализирована роль различных фотопродуктов ДНК в инициации генотоксических процессов, включая канцерогенез в коже человека при действии УФА.

Фотосенсибилизированные окислительные реакции повреждения биомолекул в модельных системах

В процессах сенсibilизированного окисления биомолекул O_2 может на начальной стадии реагировать с фотовозбужденным сенсibilизатором или участвовать на вторичных стадиях в реакциях с радикалами, возникающими от сенсibilизатора либо биомолекулы [1]. Как известно, поглощение фотона молекулой сенсibilизатора в основном синглетном состоянии S_0 приводит к образованию первого возбужденного синглетного состояния S_1 с относительно коротким временем жизни (пс–нс). Безызлучательная дезактивация S_1 -состояния может осуществляться посредством как внутренней конверсии электронной энергии, так и интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние T_1 при обращении спина электрона. Одно из следствий внутренней конверсии — возможная диссоциация молекулы сенсibilизатора с формированием радикалов, в том числе анион-радикала $\text{O}_2^{\cdot-}$, и инициация фотосенсибилизированной реакции типа I. Возникающее в процессе интеркомбинационной конверсии T_1 -состояние сенсibilизатора значительно более долгоживущее (мкс–мс), так как оба электрона имеют параллельные спины, и это способствует его вовлечению в бимолекулярные процессы. Один из важных из них — перенос энергии на O_2 с генерацией $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) — может вызывать фотосенсибилизированные реакции типа II. Возможны также и другие взаимодействия с O_2 , поскольку T_1 -состояние из-за наличия двух неспаренных электронов обладает свойством бирадикала. Таким образом, благодаря длительному времени жизни и реакционной активности T_1 -состояние играет главную роль в фотосенсибилизации. Перед рассмотрением механизмов фотосенсибилизированных окислительных реакций и принципов их разделения на тип I и тип II ниже приведены основные сведения о свойствах кислорода в триплетном состоянии $^3\text{O}_2$, синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ и супероксида кислорода $\text{O}_2^{\cdot-}$.

У молекулы кислорода на двух изоэнергетических орбиталях $^1\pi_g$ -энергетического уровня два электрона могут находиться в трех разных конфигурациях: (1) по одному электрону с параллельными спинами на каждой $^1\pi_g$ -орбитали. Эта конфигурация характеризует триплетное состояние

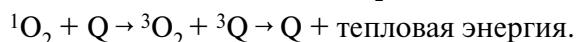
кислорода ($^3\text{O}_2$, $^1\Sigma_g^-$); (2) оба спаренных электрона с противоположными спинами на одной и той же $1\pi_g$ -орбитали (синглетное состояние $^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$); (3) электроны с противоположными спинами, но расположенные на двух разных $1\pi_g$ -орбиталях (синглетное состояние $^1\text{O}_2$, $^1\Sigma_g^+$). В основном (триплетном) состоянии кислород обладает бирадикальным свойством, ответственным за присущую ему способность вступать в реакции окисления, а также принимать электроны с переходом в химически активный супероксидный анион-радикал $\text{O}_2^{\bullet-}$ с низкой энергией активации (0,16 эВ). В обоих синглетных состояниях кислорода требуется обращение спина, но у $^1\Delta_g$ более низкая энергия активации (0,98 эВ). Кроме того, у этого состояния отсутствует радикальное свойство, скорее $^1\Delta_g$ проявляет свойство молекулы с двойной связью; время жизни $^1\Delta_g$ в воде ≈ 2 мкс. Время жизни в воде синглетного состояния $^1\Sigma_g^+$ с более высокой энергией (1,6 эВ) значительно короче ($\approx 0,1$ нс); поэтому оно практически не вовлекается в фотодинамические процессы. Оба синглетных состояния генерируются посредством переноса энергии и инверсии спина, но не путем оптических переходов из триплетного состояния, которые в обоих случаях запрещены [10]. Механизм фотосенсибилизированной генерации $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) в большинстве случаев основан на переносе энергии от возбужденной в триплетное состояние молекулы сенсibilизатора ($^3\text{S}^*$) на кислород ($^3\text{O}_2$). В соответствии с принципом сохранения суммарного спина системы реакцию можно представить в следующем виде:



где $^1\text{S}_0$ — сенсibilизатор в основном состоянии. У наиболее распространенной группы сенсibilизаторов, действующих по такому механизму, триплетные уровни выше, чем синглетный уровень кислорода.

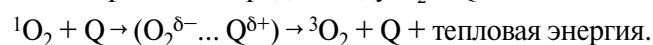
Синглетный кислород $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) может быть дезактивирован молекулами-тушителями (Q) в трех основных реакциях:

— тушение посредством переноса энергии от $^1\text{O}_2$ на низколежащие триплетные уровни молекул, не способных дезактивироваться путем обратного переноса энергии на $^3\text{O}_2$:

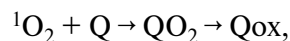


По такому механизму происходит тушение $^1\text{O}_2$ β -каротином — эффективным стабильным тушителем, присутствующим, например, в растительных клетках вблизи хлорофилла, который в отсутствие β -каротина мог бы окисляться синглетным кислородом, генерируемым переносом энергии от триплетного хлорофилла на кислород;

— тушение в результате образования комплексов с переносом заряда между O_2 и Q:



Такой механизм предложен, например, для эффективного тушителя $^1\text{O}_2$ азид натрия (NaN_3); — тушение вследствие окисления молекул-тушителей:



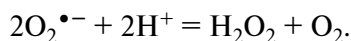
где QO_2 — первичный нестабильный пероксид, образуемый при взаимодействии Q с $^1\text{O}_2$, Qox — конечный продукт окисления молекулы. Не исключено, что формированию пероксида предшествует стадия образования комплекса с переносом заряда.

Первые два из перечисленных процессов обычно называют физическим тушением $^1\text{O}_2$, а процесс окисления молекул — химическим тушением, которое в живых клетках лежит в основе опосредованных $^1\text{O}_2$ реакций окислительной дегградации биологически важных молекул и может приводить к фотодинамическим эффектам. Различные типы этих реакций определяются характерным свойством $^1\text{O}_2$ — наличием в молекуле двойной связи. При взаимодействии с конъюгированными системами биомолекул, такими как аминокислоты (гистидин, триптофан) белков и гуанин ДНК, $^1\text{O}_2$ вступает с ними в реакцию типа Дильса—Альдера (Diels—Alder type reaction) с формированием первичных нестабильных эндопероксидов. В так называемых еновых реакциях (ene reactions) $^1\text{O}_2$ присоединяется к ненасыщенным ацильным цепям фосфолипидов, вызывая образование гидропероксидов [10].

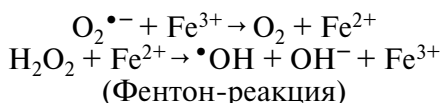
Как отмечено выше, реакции фотосенсибилизированного окисления биомолекул по механизму первичного процесса разделяют на тип I и тип II [11].

Общая характеристика фотосенсибилизированных окислительных реакций типа I и типа II. Механизм реакций типа I инициируется переносом электрона между фотовозбужденным сенсibilизатором (S^*) и молекулой биосубстрата (M), в результате чего образуется пара радикалов: анион-радикал $\text{S}^{\bullet-}$ или его протонированная форма $\text{SH}^{\bullet}$ и катион-радикал $\text{M}^{\bullet+}$ или его депротонированная форма $\text{M}^{\bullet}$ (рис. 1, реакция 1). В альтернативной первичной бимолекулярной реакции одноэлектронное восстановление O_2 фотовозбужденным сенсibilизатором приводит к формированию супероксидного анион-радикала $\text{O}_2^{\bullet-}$, который находится в равновесии со своей протонированной формой $\text{HO}_2^{\bullet}$, и катион-радикала $\text{S}^{\bullet+}$ или его депротонированной формы $\text{S}^{\bullet}$ (рис. 1, реакция 2). Супероксидный анион-радикал — это ион молекулы кислорода с одним неспаренным электроном. После первичного одноэлектронного окисления молекулы биосубстрата (реакция 1) оба формируемых радикала участвуют в нескольких последующих реакциях. Так, анион-радикал фотосенсибилизатора реагирует с O_2 , вследствие чего происходит регенерация сенсibilизатора и образуется $\text{O}_2^{\bullet-}$ (реакция 4). Общепринято, что этот процесс —

главный источник $O_2^{\bullet -}$ в фотосенсибилизированных реакциях, и он намного более значимый, чем прямое восстановление O_2 возбужденным сенсибилизатором (реакция 2). В реакции диспропорционирования $O_2^{\bullet -}$ может образовываться H_2O_2 :



Как и $\text{O}_2^{\bullet -}/\text{HO}^{\bullet}$, H_2O_2 не проявляет значительной реакционной активности в отношении большинства биомолекул. Однако H_2O_2 может мигрировать по всей клетке и вызывать в присутствии Fe^{2+} протекание Фентон-реакции — одной из двух реакций Хабера–Вайса:



Высокореакционноспособный $\bullet\text{OH}$ -радикал, образующийся в ходе этой реакции, способен реагировать в месте генерации с биомолекулами посредством присоединения к двойным связям и/или отрыва атомов водорода. Обе реакции приводят к образованию нейтральных радикалов молекул ($\text{M}^\bullet$) – вероятных предшественников пероксильных радикалов ($\text{MOO}^\bullet$), возникающих при взаимодействии $\text{M}^\bullet$ с O_2 . Процесс завершается окислительным повреждением молекул. Катион-радикал молекулы субстрата ($\text{M}^{\bullet+}$), который формируется в реакции 1, после депротонирования может подвергаться гидратации с образованием $\text{M}^\bullet\text{-OH}$. В дальнейшей реакции этой формы с O_2 путем присоединения либо одноэлектронного окисления образуются окисленные и/или окисгированные продукты (Mok) [1].

Относительно фотосенсибилизированных реакций типа I можно сделать следующие общие замечания. Эти реакции протекают с наибольшей эффективностью при высокой концентрации мо-

лекул субстрата и низкой концентрации O_2 , поскольку O_2 является сильным конкурентом молекулы субстрата за взаимодействие с триплетом сенсibilизатора. Формирование нековалентных комплексов между сенсibilизатором и субстратом до облучения увеличивает вероятность реакций типа I из-за их близости. Наиболее эффективно деградируют по механизму типа I те молекулы биосубстрата, которые легко окисляются.

В отличие от радикального механизма реакций типа I, первичный механизм реакций типа II вовлекает перенос энергии от возбужденных в триплетное состояние сенсibilизаторов к растворенному кислороду, который находится в своем основном триплетном состоянии $^3\text{O}_2$ (рис. 1, реакция 3). Это приводит к образованию синглетного молекулярного кислорода $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) в результате обращения спина одного из двух неспаренных электронов у $^3\text{O}_2$. Разница энергий между основным (триплетным) и синглетным состояниями кислорода составляет 94,2 кДж моль $^{-1}$ (0,98 эВ) и соответствует переходу в инфракрасной области (около 1270 нм). Перенос энергии от сенсibilизаторов в триплетном состоянии на кислород с переводом его в синглетное возбужденное состояние показан прямым методом измерения фотосенсibilизированной люминесценции $^1\text{O}_2$ при 1270 нм [12].

Фотосенсибилизированные реакции окисления ДНК, белков и липидов. Чувствительность отдельной биомолекулы к сенсибилизированному окислительному повреждению зависит от ее структуры, свойств фотосенсибилизатора и условий протекания реакций, в том числе от рН среды и концентрации реагирующих молекул. В большинстве случаев фотосенсибилизированные окислительные реакции в биомолекулах имеют достаточно сложный характер, поскольку часто

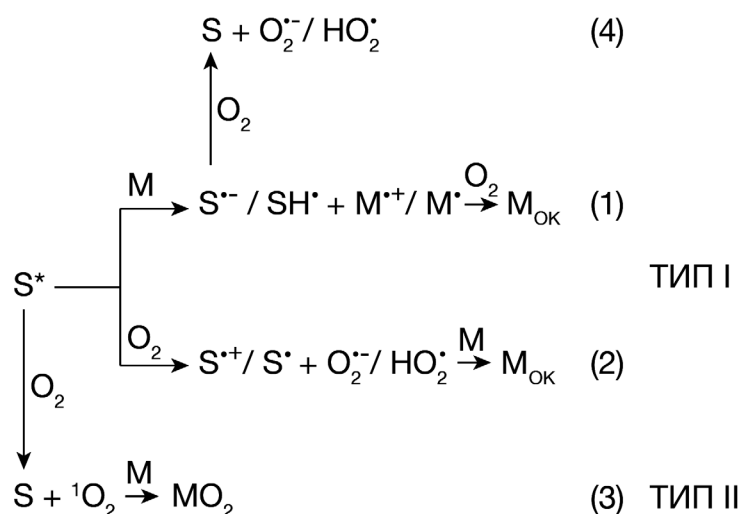


Рис. 1. Сенсibilизированные окислительные реакции типа I и типа II в биомолекулах (M), S^* – фотовозбужденный сенсibilизатор, Mok – продукт окисления молекулы.

первичный продукт нестабилен и быстро превращается во вторичные продукты, которые тоже могут быть чувствительны к сенсibilизированным фотохимическим изменениям. К фотосенсibilизаторам окислительных процессов относятся такие широко распространенные в биологических системах молекулы, как птерины, рибофлавин, протопорфирин IX и некоторые другие. Фотосенсibilизаторы вступают в окислительные реакции преимущественно в долгоживущих триплетных состояниях, на несколько порядков превышающих по времени существования время жизни их синглетных возбужденных состояний. Это особенно важно для эффективной инициации реакций типа I, поскольку сенсibilизатор в триплетном состоянии может диффундировать в среде до столкновения с молекулой субстрата — донором электрона, тогда как в синглетном возбужденном состоянии он реагирует только в том случае, если уже находится в непосредственной близости от молекулы субстрата.

Ниже рассматриваются механизмы фотосенсibilизирующей активности рибофлавина и птеринов в отношении формирования окислительных повреждений в ДНК, белках и липидах.

Рибофлавин. Молекула рибофлавина вместе с ее нуклеотидными производными флавинаденидинуклеотидом (ФАДН) и флавиномононуклеотидом (ФМН) составляют большую группу биологически значимых флавиновых соединений. Система сопряженных двойных связей изоаллоксазинового кольца флавинов определяет их фотофизические, фотохимические и спектроскопические свойства [13]. Спектры поглощения и возбуждения флуоресценции окисленных состояний флавинов имеют два максимума в области 300–500 нм — при 360 нм и 450 нм, а спектры флуоресценции — один максимум около 530 нм. При поглощении фотона УФА/синего света в изоаллоксазиновом кольце происходит перераспределение заряда и изменение редокс-потенциала флавина, что инициирует его фотохимические превращения. В молекулах ФАДН и ФМН, которые служат хромофорами в сенсорных фоторецепторных белках, фотохимические реакции, вовлекающие перенос электрона/протона, индуцируют сигнальные и регуляторные процессы в живых системах. В фотолиазах флавиновый кофактор в форме ФАДН[–] участвует в репарации CPDs и 6-4PPs путем светоиндуцированного переноса на них электрона [13–15].

В отличие от прочно связанных с белками хромофоров ФАДН и ФМН, свободный рибофлавин при фотовозбуждении проявляет выраженную сенсibilизирующую активность. Так как в возбужденном состоянии рибофлавин приобретает сильные окислительные свойства, его относят к фотосенсibilизаторам реакций типа I. Вместе с тем рибофлавин может фотосенсibilизировать

реакции типа II, поскольку способен генерировать $^1\text{O}_2$ с квантовым выходом $\Phi = 0,5$ [16].

Действие рибофлавина как фотосенсibilизатора реакций типа I продемонстрировано при изучении формирования сшивок ДНК–белок, которые возникают с участием ионизированных пуриновых оснований нуклеотидов, преимущественно G-оснований [1]. Интересно в этой связи отметить, что рибофлавин может образовывать комплексы с пуринами в растворе, о чем свидетельствует тушение его флуоресценции. Как показано в исследовании с модельными соединениями, фотосенсibilизированное рибофлавином образование $\text{G}^{\bullet+}$ в олигонуклеотиде TGT инициирует нуклеофильную реакцию с ε -аминогруппой центрального лизина в пептиде, состоящем из трех лизинов. Основной фотопродукт этой реакции — аддукт между гуанином и лизином, формирование которого происходит вследствие добавления остатка лизина к C8 гуанина [17]. В дальнейших теоретических работах, рассматривающих взаимодействия пептидов/полиаминов с ДНК, получена дополнительная информация, уточняющая механизм образования сшивок гуанин–лизин [18].

По механизму реакций типа I может происходить также фотосенсibilизированное рибофлавином окисление оснований гуанина (dG) в ДНК. При действии УФА (365 нм) 8-oxodG формируется посредством переноса электрона от dG к триплетному возбужденному состоянию рибофлавина с образованием интермедиатов — анион-радикала рибофлавина и $\text{dG}^{\bullet+}$ [1]. В последующей реакции гидратации $\text{dG}^{\bullet+}$ формируется радикал 8-гидроксидигидрогуанил ($\text{dG}^\bullet$), а далее он может превращаться в 8-oxodG O_2 -опосредованным одноэлектронным окислением (рис. 2). Радикал $\text{dG}^\bullet$ может быть индуцирован и $^\bullet\text{OH}$ посредством его присоединения к C8 гуанина, а дальнейшее превращение этого радикала в 8-oxodG тоже происходит с участием O_2 путем одноэлектронного окисления (рис. 2). Как показано выше, $^\bullet\text{OH}$ образуется в Фентон-реакции из H_2O_2 — продукта диспропорционирования $\text{O}_2^{\bullet-}$. Механизм, основанный на гидратации $\text{dG}^{\bullet+}$, предложен для объяснения формирования 8-oxodG в клеточной ДНК при воздействии УФА на культивируемые клетки млекопитающих в присутствии рибофлавина [1].

Наиболее эффективно фотосенсibilизированное образование 8-oxodG в ДНК происходит в реакции окисления гуанина $^1\text{O}_2$. Известно, что $^1\text{O}_2$ как электрофил может реагировать со многими богатыми электронами биомолекулами. Вместе с тем, в ДНК из пиримидиновых и пуриновых оснований только у гуанина выявлена селективная реакционная активность по отношению к $^1\text{O}_2$ в водных растворах, и это согласуется с данными о наивысшей константе скорости химического тушения $^1\text{O}_2$ гуанином ($5,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [19]. Процесс,

инициирующий формирование 8-oxodG, состоит в присоединении $^1\text{O}_2$ к имидазольному кольцу гуанина посредством реакции Дильса–Альдера, сопровождаемой образованием 4,8-эндопероксида гуанина (рис. 3). Формирование исключительно 8-oxodG в ДНК объясняется реорганизацией эндопероксида преимущественно в 8-гидропероксигуанин с последующей конверсией этого нестабильного интермедиата в 8-гидроксигуанин, который находится в динамическом равновесии с 8-oxodG – более стабильным таутомером в растворе [20].

Из аминокислот, входящих в состав белков, эффективно окисляются в фотосенсибилизированных реакциях гистидин, метионин, триптофан и цистеин [19]. Гистидин подвергается окислению в основном по механизму типа II. Поэтому его часто используют в качестве специфического акцептора $^1\text{O}_2$ (бимолекулярная константа скорости ту-

шения $^1\text{O}_2$ гистидином составляет $7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Первичным продуктом при взаимодействии гистидина с $^1\text{O}_2$ является эндопероксид, который формируется в реакции Дильса–Альдера (рис. 4).

Метионин может фотоокисляться как в реакциях типа I, так и типа II. В случае протекания фотосенсибилизированной реакции типа I конечным продуктом является метионал (β -метилмеркаптопропиональдегид). Такой продукт обнаружен в реакционной системе при использовании в качестве сенсibilизатора рибофлавина. Показано, что рибофлавин в триплетном состоянии отрывает электрон от атома серы в аминокислоте, и образующийся радикал метионина подвергается дезаминированию и декарбоксилированию до метионала. В результате окисления метионина $^1\text{O}_2$ (константа скорости реакции $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) конечным продуктом является сульфоксид.

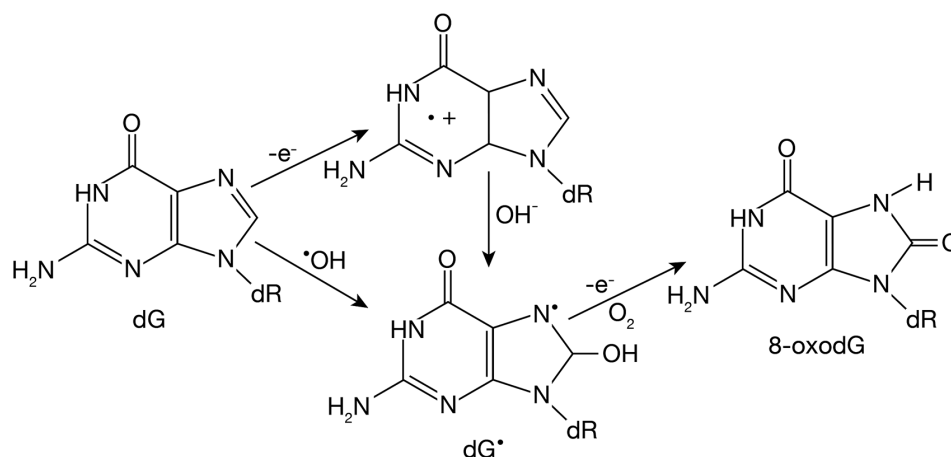


Рис. 2. Фотосенсибилизированное окисление гуанина (dG) в ДНК по механизму типа I. Показаны два пути образования нейтрального гидроксигуанил-радикала ($\text{dG}^\bullet$) – предшественника 8-oxodG: в результате гидратации $\text{dG}^{\bullet+}$ или присоединения $^\bullet\text{OH}$ к dG с последующим O_2 -зависимым одноэлектронным окислением $\text{dG}^\bullet$.

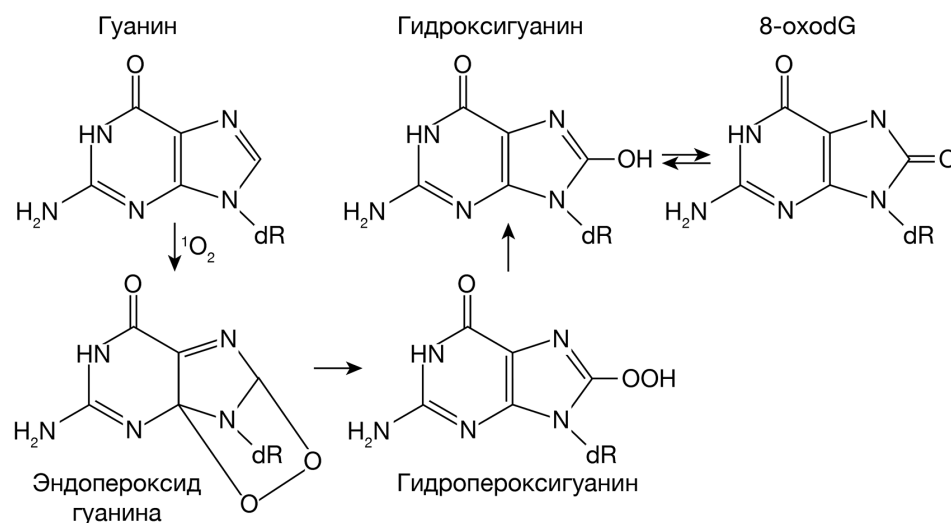


Рис. 3. Реакция окисления синглетным кислородом гуанина в ДНК. Первый продукт реакции, формируемый присоединением $^1\text{O}_2$ к имидазольному кольцу гуанина (эндопероксид), подвергается реорганизации с образованием гидропероксигуанина, который восстанавливается в гидроксигуанин, находящийся в динамическом равновесии с наиболее стабильным конечным продуктом окисления 8-oxodG.

Механизмы фотосенсибилизированного окисления триптофана могут вовлекать как опосредуемые $^1\text{O}_2$ реакции, так и реакции типа I с участием радикальных состояний. При окислении $^1\text{O}_2$ (константа скорости реакции $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) вначале образуется эндопероксид триптофана, который затем превращается в N-формилкинуренин.

Образуемые в результате окисления аминокислотных остатков пероксиды и соединения с карбонильной группой способны ингибировать активность белков. При взаимодействии радикала $\bullet\text{OH}$ с белками, содержащими цистеин, происходит отрыв атома водорода от его сульфгидрильной группы и образование тиолового радикала. Сшивки тиоловых радикалов двух цистеинов формируют димеры цистеина через дисульфидный мостик и агрегаты более высокого порядка. Сшивки могут также образовываться в результате окисления остатков гистидина до содержащих карбонильную группу соединений при их взаимодействии с боковыми цепями остатков лизина, цистеина и аргинина. Ковалентные сшивки, лежащие в основе формирования высокомолекулярных агрегатов, — общее следствие окисления

белков. Окислительная деградация аминокислотных остатков сопровождается заметными изменениями в физико-химических свойствах белков, подавлением активности связанных с мембраной ферментов и нарушением транспортных функций мембран.

В липидах наиболее чувствительны к фотосенсибилизированному окислению ненасыщенные жирные кислоты (НЖК) и холестерин; они могут быть окислены как в реакциях типа I, так и типа II. В обоих случаях основными промежуточными продуктами являются гидропероксиды, а конечными — альдегиды, кетоны и др. Последние могут взаимодействовать с NH_2 - и тиольными группами мембранных белков, приводя к их инактивации и/или функциональным изменениям [21].

На рис. 5 приведена общая схема реакций фотосенсибилизированного перекисного окисления НЖК липидов (lipids, LH), демонстрирующая два механизма образования гидропероксидов (LOOH) — тип I, который вовлекает радикальные интермедиаты и O_2 , и тип II, вовлекающий $^1\text{O}_2$.

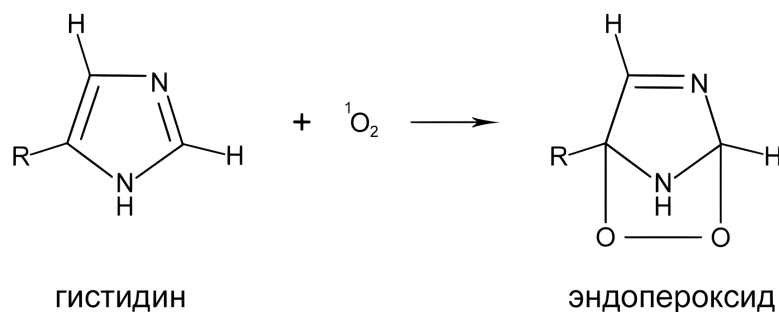


Рис. 4. Формирование эндопероксида — первичного продукта взаимодействия $^1\text{O}_2$ с гистидином посредством реакции Дильса–Адлера.

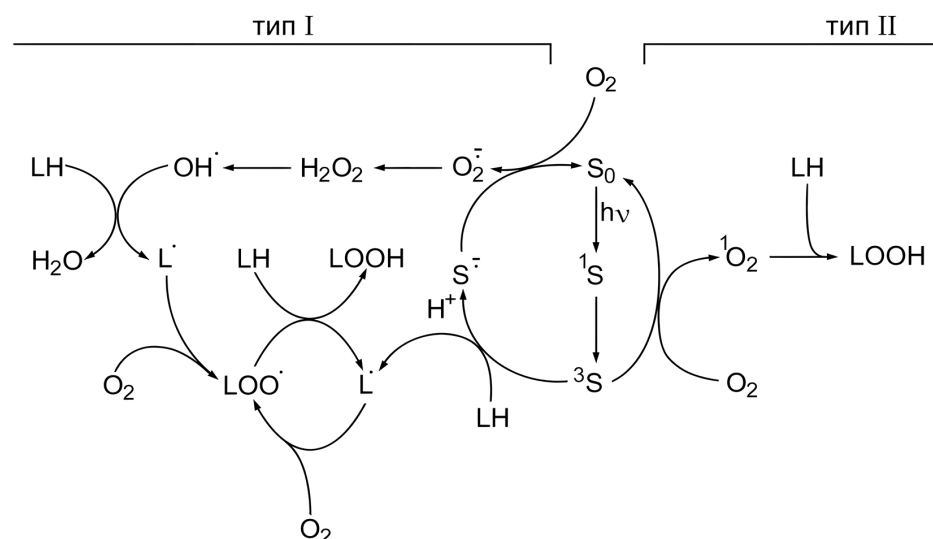


Рис. 5. Два типа фотосенсибилизированных реакций перекисного окисления липидов с образованием гидропероксидов (LOOH).

В реакциях типа I вначале происходит перенос атома водорода от LH к триплетному состоянию фотосенсибилизатора 3S . Это вызывает формирование алкильного радикала $L^\bullet$, радикала сенсибилизатора $SH^\bullet$ и далее его депротонированной формы $S^{\bullet-}$. Взаимодействие $L^\bullet$ с O_2 приводит к образованию пероксильного радикала ($LOO^\bullet$), последующие реакции которого с другими LH генерируют новые радикалы $L^\bullet$ и гидропероксиды ($LOOH$). При окислении $S^{\bullet-}$ O_2 образуются $O_2^{\bullet-}$ и основное состояние сенсибилизатора (S_0), который может вновь участвовать в радикальных процессах. Диспропорционирование $O_2^{\bullet-}$ в H_2O_2 может привести в Фентон-реакции к формированию $^\bullet OH$ -радикала, инициирующего перекисное окисление липидов путем отрыва атома водорода от LH (константа скорости реакции $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

В реакциях типа II на начальной стадии происходит перенос энергии с триплетного сенсибилизатора на O_2 с образованием 1O_2 , способного реагировать с НЖК и холестерином, переводя их в гидропероксиды. Поскольку 5α -ООН-холестерин не образуется в реакциях, имеющих чисто радикальную природу (тип I), этот продукт используется как доказательство участия 1O_2 в фотосенсибилизированных реакциях в биологических мембранах. Сенсибилизированное фотоокисление липидов вызывает структурные изменения в мембранах, что приводит к резкому снижению барьеров их проницаемости и нарушению ряда функций [21].

Птерины. Эти распространенные в живых организмах гетероциклические соединения представляют собой сопряженные системы двух колец — пиримидинового и пиазинового. Семейство птеринов включает множество производных, которые отличаются природой боковых заместителей, присоединенных к пиазиновому кольцу. К ним относятся окисленная форма птерина (pterin, Ptr), 7,8-дигидроптерин (7,8-dihydropterin, H_2Ptr), 6-формилптерин (6-formylpterin, For), 6-карбоксиптерин (6-carboxypterin, Car), неоптерин (neopterin, Nep), биоптерин (biopterin, Bip), 7,8-дигидробиоптерин (7,8-dihydrobiopterin, H_2Bip) и 5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, H_4Bip), а также фолиевая кислота (folic acid — pteroyl-L-glutamic acid, PteGlu). Отдельные представители птеринов выполняют биохимические функции, действуя как коферменты в реакциях синтеза физиологически активных соединений (H_4Bip) или азотистых оснований (PteGlu). 5,10-Метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate) — один из производных PteGlu — присутствует в ДНК-фотолиазах как светособирающая антенна, передающая энергию возбуждения к кофактору ФАДН⁻ [13, 15]. Некоторые производные птеринов вовлекаются в фотобиологические процессы, и поэтому изучение их фотофизических

и фотохимических свойств вызывает неослабевающий интерес у исследователей.

При возбуждении в области УФА (365 нм) эти биомолекулы флуоресцируют с максимумом в спектре флуоресценции при 440–450 нм, генерируют АФК (1O_2 , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2) и подвергаются фотоокислительной деградации с образованием различных продуктов, которые тоже могут обладать сенсибилизирующими свойствами [22]. Под действием солнечного света птерины накапливаются в коже человека и, генерируя в возбужденном состоянии АФК, вызывают фотоокислительный стресс; он особенно проявляется в коже с патологией витилиго (vitiligo), связанной с образованием белых (депигментированных) пятен. Накопление в них Bip происходит вследствие фотосенсибилизированного окисления H_4Bip , и, как показано в экспериментальных и теоретических исследованиях, реакции окисления H_4Bip могут происходить по механизмам фотосенсибилизации как типа I, так и типа II [23, 24].

Птерины в окисленной форме (Ptr) при возбуждении УФА способны генерировать АФК в процессах переноса энергии (1O_2) или электрона ($O_2^{\bullet-}$) триплетным состоянием Ptr. Формирование $O_2^{\bullet-}$ в результате переноса электрона между анион-радикалом птерина ($Ptr^{\bullet-}$) и O_2 приводит к образованию H_2O_2 в реакции диспропорционирования $O_2^{\bullet-}$. Дигидроптерин (H_2Ptr) не генерирует 1O_2 , но окисляется в присутствии 1O_2 с высокой константой скорости, образуя H_2O_2 и Ptr-производные, которые могут быть сенсибилизаторами образования 1O_2 [22]. При изучении генерации 1O_2 производными Ptr установлено, что квантовые выходы образования 1O_2 в водном растворе сильно зависят от химической природы их боковых заместителей, а также от pH среды. В этих экспериментах значения квантовых выходов определяли путем анализа фосфоресценции 1O_2 при 1270 нм после возбуждения птеринов в области УФА (337 нм) [25]. Согласно полученным данным, наиболее эффективно сенсибилизируют формирование 1O_2 For, Bip, Car и Nep с квантовыми выходами в зависимости от pH среды для каждого птерина в диапазонах 0,45–0,47; 0,34–0,40; 0,27–0,37 и 0,23–0,34 соответственно. Поэтому эти производные Ptr рассматриваются как возможные сенсибилизаторы фотодинамических процессов *in vivo* [22]. Индуцированная УФА генерация Ptr-производными $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 в водных растворах может происходить по двум различным механизмам. В основе первого механизма лежит процесс переноса электрона от молекулы — донора электрона к триплетному состоянию Ptr, что вызывает его переход в анион-радикал $Ptr^{\bullet-}$. При взаимодействии $Ptr^{\bullet-}$ с O_2 формируется $O_2^{\bullet-}$, реакция диспропорционирования которого приводит к образованию H_2O_2 . Второй механизм генерации $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 связан с окислением интермедиата, ко-

торый возникает при воздействии УФА на Ptr-производные — Bir и Ner. Показано, что интермедиат (наиболее вероятно, формил-5,8-дигидроптерин) быстро окисляется кислородом, переходя в For. В этой реакции также образуются $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 . Завершается окислительный процесс фотоиндуцированным превращением For в Car и дополнительным образованием H_2O_2 [22]. Выше отмечено, что For и Car могут действовать и как фотосенсибилизаторы образования 1O_2 .

Способность фотохимически генерировать 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 определяет сенсибилизирующие свойства птеринов, которые проявляются в индуцированном УФА окислительном повреждении биомолекул, включая нуклеотиды, триптофан и тирозин [26]. В ряде работ, направленных на изучение механизмов фотосенсибилизирующего действия птеринов, в качестве окисляемых молекул использовали пуриновый нуклеотид (2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate, dGMP) [27, 28]. Установлено, что в случае окисления dGMP, опосредованного птеринами (Ptr, Bir, For и Car) в нейтральной форме, в которой они присутствуют в нейтральной и кислой среде, преобладает механизм фотосенсибилизации типа I. Он вовлекает иницирующий перенос электрона от нуклеотида к триплетному возбужденному состоянию птерина, сопровождаемый формированием $Ptr^{\bullet-}$ и катион-радикала $dGMP^{\bullet+}$, депротонирование и гидратация которого приводят к окислительной деградации нуклеотида. В отсутствие O_2 эти стадии окислительного процесса блокируются из-за рекомбинации радикалов $Ptr^{\bullet-}$ и $dGMP^{\bullet+}$ и их перехода в исходные состояния. В щелочной среде отмеченные выше птерины находятся в анионной форме, и фотосенсибилизированное окисление dGMP может вовлекать реакции с участием 1O_2 .

Как известно, из всех оснований нуклеотидов у гуанина самый низкий потенциал ионизации, и поэтому фотосенсибилизаторы типа I индуцируют только его одноэлектронное окисление. В этой связи представляют интерес данные, демонстрирующие способность птерина (Ptr) фотосенсибилизировать окисление тимина в пиримидиновом нуклеотиде (thymidine 5'-monophosphate, dTMP) [29]. Иницированный УФА перенос электрона от нуклеотида к триплетному состоянию Ptr приводит к формированию $Ptr^{\bullet-}$ и катион-радикала $dTMP^{\bullet+}$, который находится в равновесии с формой $dTMP(-H)^{\bullet}$, а $Ptr^{\bullet-}$ протонируется до $PtrH^{\bullet}$. В последующих реакциях этих радикалов с O_2 , включающих генерацию АФК, образуется ряд конечных продуктов деградации dTMP.

В отсутствие O_2 был обнаружен еще один процесс, не наблюдавшийся при действии других сенсибилизаторов, а именно связывание радикалов $PtrH^{\bullet}$ и $dTMP(-H)^{\bullet}$ с образованием аддукта $H_2Ptr-dTMP(-H)$. После добавления O_2 формиро-

вался аддукт $Ptr-dTMP(-2H)$ с регенерированной конъюгированной структурой Ptr [29]. Важно отметить, что при воздействии УФА в отсутствие O_2 аддукт между птерином и основанием тимина формируется также в двухцепочечной ДНК [30]. Согласно выдвинутому предположению, формирование такого аддукта может происходить и в клеточной ДНК. Это обосновывается следующими фактами: во-первых, концентрация O_2 в некоторых тканях может быть очень низкой; во-вторых, Ptr свободно проникает через биомембраны, т.е. может находиться в ядре; в-третьих, концентрация Ptr, использованная в работе с изолированной ДНК, сопоставима с концентрацией птеринов в клетках кожи. В соответствии с приведенными данными птерины рассматриваются как потенциальные эндогенные фотосенсибилизаторы, способные индуцировать генотоксические процессы [30].

Изложенный выше материал показывает, что процессы фотосенсибилизированного окислительного повреждения биомолекул могут включать одну или несколько из различных активированных форм, таких как возбужденные светом состояния молекул, радикалы и АФК. Поэтому даже в случае гомогенных растворов не всегда можно однозначно установить механизмы реакций, а в такой сложной системе, как живая клетка, определение конкретных механизмов фотосенсибилизированных процессов становится еще более трудной задачей. Распространенный экспериментальный подход, используемый при решении данной проблемы, связан с выяснением вопроса о том, образуется ли синглетный кислород в фотосенсибилизированной реакции и ответственный ли он за последующее повреждение биологической системы. Для этого часто исследуют влияние веществ, вызывающих тушение 1O_2 , на скорость фотосенсибилизированного процесса. Так, если фотосенсибилизированная реакция ингибируется низкими концентрациями азидата натрия (очень эффективный физический тушитель 1O_2), то это обычно интерпретируется как участие в ней 1O_2 . Однако такое утверждение может быть корректным только в том случае, если установлено, что ингибитор не тушит триплетное состояние сенсибилизатора, поскольку это также уменьшило бы скорость реакции. Нельзя, по видимому, однозначно судить об участии 1O_2 в фотосенсибилизированной реакции и на основании данных о фотоокислении некоторых молекул акцепторов (фураны, гистидин и др.), способных эффективно окисляться 1O_2 . Действительно, показано, что такие соединения могут быть окислены, причем до тех же продуктов, и в результате протекания радикальных реакций. Одним из немногих специфичных для детектирования 1O_2 акцепторов является холестерин: его реакция с 1O_2 приводит к образованию единственного продукта (5 α -гидропероксид), тогда как при взаимодей-

ствии с радикалами образуется смесь других продуктов. Еще один способ определения участия $^1\text{O}_2$ в фотосенсибилизированной реакции заключается в сравнении скорости процесса в обычной (H_2O) и тяжелой (D_2O) воде. Поскольку время жизни $^1\text{O}_2$ в ~ 20 раз больше в D_2O , чем в H_2O , значительное увеличение скорости реакции в D_2O рассматривается как указание на участие в ней $^1\text{O}_2$. Следует, однако, отметить, что лучшим аргументом в пользу вовлечения $^1\text{O}_2$ в фотосенсибилизированные реакции окисления биомолекул в модельных системах считается регистрация люминесценции $^1\text{O}_2$ при 1270 нм [12].

Индукцированные УФА окислительные повреждения ДНК и других биомолекул в клеточных системах: роль в цитотоксических и генотоксических процессах

В последнее время изучению молекулярных механизмов действия УФА на клеточные системы посвящены обширные и всесторонние исследования. В них значительное внимание уделяется определению роли различных АФК в инициации процессов фотосенсибилизированного окислительного повреждения клеточной ДНК и других биомолекул. В ряде работ продемонстрировано, что индуцированное УФА формирование 8-oxodG в клеточной ДНК обусловлено главным образом селективным окислением G-основания синглетным кислородом [31, 32]. Помимо этого, гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$) вносит дополнительный вклад в деградацию ДНК, вызывая образование окисленных оснований и одноцепочечных разрывов [32].

Сенсибилизированные окислительные реакции вовлекаются в фотодинамические цитотоксические эффекты и канцерогенное действие УФА. В клетках различных организмов, в том числе кожи человека, содержится много хромофоров, поглощающих в области УФА. На основании приведенных выше данных, полученных в модельных экспериментах, птерины и рибофлавин можно рассматривать как потенциальные фотосенсибилизаторы окислительного повреждения биологически важных молекул в клеточных системах, однако прямые доказательства этого пока отсутствуют. Вместе с тем, как показано в серии работ, результаты которых рассматриваются ниже, протопорфирин IX и его производные могут действовать в клетках дрожжей как фотосенсибилизаторы окислительных цитотоксических процессов. Активностью фотосенсибилизатора окислительного стресса в меланоцитах обладает и пигмент эпидермиса меланин, известный также своей фотозащитной функцией.

Фотодинамические окислительные реакции, сенсибилизированные протопорфирином IX в клеточных структурах: вклад в цитотоксический эффект. Протопорфирин IX — классический сенси-

билизатор фотодинамических реакций типа II. В абсорбционном спектре протопорфирина IX главный максимум расположен при 400–410 нм и есть небольшие пики в области 500–620 нм. Вместе с тем протопорфирин IX интенсивно поглощает фотоны во всей области УФА, что расширяет спектральный диапазон его фотосенсибилизирующей активности, связанной с генерацией $^1\text{O}_2$. Тушение возбужденного триплетного состояния протопорфирина IX молекулярным кислородом с образованием $^1\text{O}_2$ происходит с высоким квантовым выходом ($\Phi \approx 6$). С другой стороны, эффективность реакций отрыва электрона от большинства биомолекул у протопорфирина IX низка. Поэтому он, в отличие от рассмотренных выше сенсибилизаторов, почти не вовлекается в фотосенсибилизированные окислительные реакции типа I.

В серии исследований протопорфирин IX и его производные были идентифицированы как эндогенные сенсибилизаторы фотодинамических реакций, вызывающих цитотоксический эффект у дрожжей. В митохондриях протопорфирин IX сенсибилизирует реакции перекисного фотоокисления липидов (ПФОЛ) [33]. На клеточном уровне это проявляется в ингибировании дыхания дрожжей. Продукт ПФОЛ малоновый диальдегид (МДА) определен также в изолированных из клеток плазматических мембранах [33], и, как было показано [34], реакции ПФОЛ инициируются преимущественно $^1\text{O}_2$, фотогенерируемым мембранно-связанным сенсибилизатором. На основании флуоресцентных характеристик, полученных при изучении фотовыцветания протопорфирина IX [35], этот сенсибилизатор можно отнести к продукту протопорфирина IX хлоринового типа. Сенсибилизированные им реакции ПФОЛ вызывают деструкцию барьеров проницаемости плазматических мембран [34].

В связи с вопросом о вкладе продуктов ПФОЛ в цитотоксический эффект у дрожжей представляет интерес работа, в которой показано, что электрофильные ненасыщенные альдегиды, включая МДА, образующиеся вследствие разложения нестабильных пероксидов липидов, способны мигрировать по всей клетке и реагировать с основаниями ДНК — в основном с гуанином. МДА присоединяется к 2-экзоциклической аминогруппе гуанина с последующей циклизацией и формированием после дегидратации циклического диола [36]. Вполне вероятно, что такого рода альдегидные аддукты могут образовываться в ДНК дрожжевой клетки в результате присоединения к основаниям гуанина продуктов ПФОЛ — процесса, эффективно сенсибилизируемого протопорфирином IX и его производными в клеточных структурах. В этом мог бы заключаться вклад ПФОЛ не только в фотодинамический цитотоксический эффект, но и в изменение спектра мутаций в ДНК клеток. Данное пред-

положение, однако, требует экспериментального подтверждения.

Роль различных УФ-индуцированных повреждений ДНК в канцерогенезе кожи человека. Как отмечено выше, канцерогенез в коже человека связан с воздействием УФ-излучения солнца, причем обе области УФ-излучения (УФВ и УФА) могут индуцировать меланому и базальную клеточную карциному. Ключевую роль в начальной фазе развития раковых опухолей играет УФ-индуцированное повреждение ДНК. Упомянутая выше система эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) репарирует димерные фотопродукты в ДНК и играет важную роль в предотвращении УФ-индуцированного рака кожи. Несколько генетических заболеваний у людей, таких как пигментная ксеродерма, связаны с дефектом в NER. Клетки от таких пациентов сверхчувствительны к действию УФ-излучения, и частота случаев рака кожи у них возрастает на несколько порядков, что может свидетельствовать о вкладе пиримидиновых димеров в развитие меланомы и карциномы [2].

Известны два главных пути действия NER по устранению УФ-индуцированных пиримидиновых димеров в ДНК. Первый путь связан с репарацией CPDs и 6-4PPs во всем геноме (global genome repair, GGR), второй – с репарацией дефектов вдоль активно транскрибируемых цепей ДНК (transcription-coupled repair, TCR) [7, 37]. В системе GGR центральным инициатором процесса является белковый комплекс Xeroderma Pigmentosum группы C (XPC)–RAD23, который способен связываться с дефектами в ДНК. Дефекты индуцируют структурные изменения в цепи ДНК и слабые спаривания оснований, вызывая уменьшение энергетического барьера, который XPC-комплексу необходимо преодолеть для эффективного связывания с сайтом повреждения [38]. Этот процесс позволяет объяснить, каким образом XPC-комплекс детектирует разные дефекты в ДНК, и почему идентификация конкретного повреждения может быть более эффективной. Например, 6-4PP вызывает большую термодинамическую дестабилизацию спиральной структуры, вследствие чего опознание 6-4PP комплексом XPC предпочтительнее, чем опознание CPD. В GGR-пути вначале дефект опознается сенсорным комплексом UV–DDP (DNA damage binding protein), который, связываясь с повреждением, вовлекает на второй стадии опознания комплекс RAD4/XPC. Этот комплекс вовлекает транскрипционный фактор TFIIH, и XPD приступает к финальной стадии опознания и репарации дефекта, на которой поврежденная область ДНК вырезается в результате двойного надреза, и брешь заполняется синтезом ДНК [7]. При действии системы TCR опознание повреждений основано на остановке РНК-полимеразы II (RNA Pol II), и поэтому TCR репарирует дефекты (пиримидиновые димеры) преимущественно

в транскрибируемой цепи ДНК. Остановку и арест полимеразы могут вызывать разрывы и модифицированные нуклеотиды. Интересно, что решающее значение для опознания повреждений имеет взаимодействие между RNA Pol II и CSB (Cockayne Syndrome protein B) [39] (мутации в гене CSB приводят к генетическому заболеванию «синдром Коккейна»). В соответствии с предложенной моделью CSB связывает задержанную RNA Pol II и способствует ее транслокации, повышая эффективность обхода 8-oxodG, но не димеров пиримидинов, которые вызывают остановку и арест полимеразы, что сопровождается блокированием транскрипции [40–42]. Таким образом, TCR-путь представляет эффективный механизм опознания УФ-индуцированных димеров, и этот процесс зависит от остановки РНК-полимеразы и ее связывания с CSB в сайте повреждения.

Помимо двух рассмотренных путей NER, значительную роль в защите клеток и тканей от окислительного стресса, различных токсинов и канцерогенов играет сигнальный путь Nrf2/ARE (nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2/ antioxidant response element) [43]. Редокс-чувствительный транскрипционный фактор Nrf2 в ответ на АФК аккумулируется в ядре и связывается с генами, содержащими антиоксидант-реагирующий элемент (ARE), что приводит к активации многих генов антиоксидантов и детоксикационных ферментов. В частности, в недавнем оригинальном исследовании продемонстрировано влияние полиморфизма гена фермента 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (8-oxoguanine-DNA-glycosylase, OGG1) на эффективность удаления продукта окисления гуанина 8-oxodG [44]. Можно также отметить, что Nrf2 является важнейшим регулятором экспрессии ключевых генераторов и поглотителей АФК, участвует во второй линии защиты митохондриальной ДНК и включает ферменты, ответственные за восстановление поврежденных оснований и нуклеотидов.

Как уже отмечалось, УФ-индуцированное повреждение ДНК играет ключевую роль в индукции канцерогенеза в коже человека. Если фотопродукты в ДНК остаются нерепарированными или поврежденные клетки (меланоциты, кератиноциты) не устраняются в процессе апоптоза, определенные дефекты ДНК проявляют свои мутагенные свойства, вызывая активацию онкогенов. Результаты многих исследований последнего времени свидетельствуют, что УФВ и УФА вызывают разные типы и количества повреждений в ДНК меланоцитов и кератиноцитов, и этим можно объяснить различия в спектрах мутаций у меланом и карцином.

Базальная клеточная карцинома возникает из кератиноцитов, находящихся в базальном слое эпидермиса и подвергающихся неконтролируемому делению, что является характерной особенностью

стью раковых клеток. УФ-индуцированные повреждения в ДНК кератиноцитов формируют мутации только в том случае, если клетка поделится прежде, чем она способна осуществить репарацию поврежденной ДНК. Также имеет значение тот факт, что разные дефекты в ДНК различаются по своему мутагенному потенциалу. Это особенно относится к цитозин-содержащим димерным фотопродуктам, поскольку они значительно более мутагенны по сравнению с тимин-содержащими CPDs и (6-4)PPs. Согласно результатам ряда исследований, основным классом фотопродуктов ДНК при облучении УФА клеток и кожи человека являются CPDs, как это характерно для УФВ. Однако, в отличие от УФВ, фотоны которого индуцируют димеры, состоящие из оснований тимина и цитозина, УФА индуцирует в большей степени димеры, содержащие тимин, и не вызывает формирования (6-4)PPs [5].

Значительный интерес представляют данные, полученные при изучении зависимости образования тимин-содержащих димеров от проникновения фотонов УФВ или УФА1 (340–400 нм) в различные слои эпидермиса кожи человека. Показано, что количество димеров, индуцированных УФВ, уменьшается с увеличением глубины эпидермиса, тогда как их количество при действии УФА1 значительно возрастает с глубиной, достигая максимума в базальном слое эпидермиса. Ослабление эффективности действия УФВ объясняется наличием в верхних слоях эпидермиса хромофоров, поглощающих фотоны этого излучения. Фотоны УФА1 в меньшей степени поглощаются хромофорами верхних слоев и поэтому могут проникать в эпидермис глубже. Согласно выдвинутому предположению, повышенная чувствительность базального слоя эпидермиса, где находятся кератиноциты (и меланоциты), к генотоксическому действию УФА1 может быть связана с обратным дермальным рассеянием этого излучения (например, от коллагена), а также прямым эпидермальным рассеянием [45].

Главный индуцированный УФА продукт и биомаркер окислительного повреждения ДНК, 8-oxodG, формируется в клетках и коже человека преимущественно в реакции, опосредованной $^1\text{O}_2$. Другие окислительные реакции, инициирующие образование 8-oxodG, а также малого количества окисленных пиримидиновых оснований и разрывов цепи ДНК, вовлекают ОН [31, 32]. Упомянутый выше фермент репарации ДНК OGG1 специфически репарирует 8-oxodG, предотвращая GC→TA-мутации, возникающие из этого фотопродукта. Фермент OGG1 слабо экспрессируется в базальном слое эпидермиса человека по сравнению с верхними эпителиальными слоями. Предполагается, что экспрессия OGG1 регулируется состоянием дифференцированности кератиноцитов и поэтому в дифференцированных клетках

происходит повышенная экспрессия фермента. Соответственно, фотопродукт 8-oxodG репарируется медленнее в базальном слое, нежели в верхних слоях эпидермиса, и это может лежать в основе высокой чувствительности базального слоя эпидермиса к накоплению 8-oxodG. К тому же в кератиноцитах при облучении УФА с высоким выходом, в три раза превышающим количество 8-oxodG, образуются тимин-содержащие димеры, из которых могут развиваться мутации GC→AT, а мутации GC→TA, возникают, вероятно, из 8-oxodG. Эти мутации обнаруживаются, соответственно, в генах p53 и Brm немеланомных типов рака кожи человека. Уязвимость базального слоя эпидермиса в отношении накопления отмеченных фотопродуктов и мутаций позволяет предполагать, что кожа человека более чувствительна к канцерогенезу, индуцированному УФА, чем считалось ранее [46].

В последнее время появились сообщения о возникновении в ДНК кератиноцитов под действием УФА1 задержанных во времени «темновых» CPDs и окисленных фотопродуктов. Было также показано формирование «темновых» CPDs в коже человека через 2 ч после воздействия излучения с длиной волны 385 нм, причем они сохранялись в течение 24 ч [47, 48]. Изучение молекулярных механизмов первичных фотопроцессов и последующих «темновых» стадий формирования CPDs и других фотопродуктов в ДНК кератиноцитов представляется одной из важных задач дальнейших исследований, направленных на выяснение вклада УФА в канцерогенез кожи человека.

Меланома происходит из меланоцитов, которые отличаются от кератиноцитов резистентностью к апоптозу и спектром мутаций в активированных онкогенах, возникающих, очевидно, из другого класса УФ-индуцированных повреждений ДНК. При определении дефектов ДНК, формируемых под действием УФВ или УФА в меланоцитах и кератиноцитах человека, было установлено, что CPDs образуются с одинаковой эффективностью в обоих типах клеток, облученных как УФВ, так и УФА. В то же время, при воздействии УФА количество 8-oxodG в 2,2 раза было выше в меланоцитах по сравнению с кератиноцитами. Таким образом, продукты окислительных реакций, индуцируемых УФА, вносят больший вклад в повреждение ДНК меланоцитов, чем кератиноцитов, что, как предполагается, связано с фотосенсибилизирующей активностью меланина, синтезируемого в меланоцитах [49]. О важной роли меланина в индукции меланомы при облучении меланоцитов УФА свидетельствуют данные, согласно которым для формирования в ДНК 8-oxodG и последующего возможного образования GC→TA-трансверсий требуется присутствие пигмента меланина в меланоцитах. В противоположность этому, действие УФВ инициирует развитие меланомы из беспиг-

ментных меланоцитов и связано с прямым формированием CPDs, из которых могут возникать CC→TT-транзиции в ДНК [50].

В ряде работ показано, что облучение УФВ или УФА меланоцитов человека, содержащих меланин, индуцирует задержанное на несколько часов образование CPDs в темноте после их фотохимического формирования [51]. Вместе с тем облучение УФА беспигментных меланоцитов не вызывало образования «темновых» CPDs. На основании защитного действия антиоксидантов предположили, что в формирование «темновых» CPDs вовлекается окислительный процесс с участием меланина [51, 52]. Как известно, при клеточном ответе на УФ-индуцированный стресс через некоторое время ферментативно образуются $O_2^{\bullet-}$ и $NO^{\bullet}$ и их рекомбинация генерирует пероксинитрит ($ONOO^-$). Было постулировано, что $ONOO^-$ реагирует с мономерами меланина, образуя нестабильные диоксетаны вблизи ДНК, а после их распада в триплетно-возбужденные карбонилы формируются CPDs в темноте путем триплет-триплетного переноса энергии от карбонилов к пиримидиновым основаниям ДНК [51–53]. Предложенный механизм химического возбуждения может лежать в основе перераспределения в составе CPDs, а именно – значительного возрастания количества димеров с цитозином и тиминном, которые более мутагенны по сравнению с тимин-содержащими димерами, индуцируемыми УФА. В недавнем исследовании продемонстрирована роль меланина в формировании «световых» и «темновых» CPDs в эпидермисе кожи типа Fitzpatrick (Fitzpatrick skin type, FST) I/II и VI при воздействии излучения, имитирующего излучение солнца [54]. «Темновые» CPDs максимально формировались через 1–2 ч после облучения – вероятно, в результате окислительных реакций, фотосенсибилизированных меланином.

Заключение

В заключение можно констатировать, что фотосенсибилизированные реакции окислительного повреждения ДНК и липидно-белковых компонентов мембран играют важную роль в инициации генотоксических и цитотоксических процессов при действии УФА на биологические системы. Благодаря всесторонним и детальным исследованиям последнего времени получены результаты, углубляющие понимание механизмов фотосенсибилизированных окислительных реакций и позволяющие строго разделить их на тип I и тип II. Окислительные реакции типа I инициируются переносом электрона между фотовозбужденным сенсибилизатором и биомолекулой, в результате чего образуется пара радикалов, вступающих в реакции с O_2 , а взаимодействие анион-радикала сенсибилизатора с O_2 вызывает образование АФК ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $^{\bullet}OH$). Первичный механизм реакций

типа II вовлекает перенос энергии от фотовозбужденного сенсибилизатора к O_2 , что приводит к формированию 1O_2 ($^1\Delta_g$). В обзоре суммированы обширные данные о механизмах вовлечения этих реакций в образование 8-oxodG – главного фотопродукта окисления гуанина и биомаркера сенсибилизированного окислительного повреждения ДНК. Также рассмотрены фотосенсибилизированные реакции окислительной дегградации НЖК липидов и аминокислотных остатков белков. Специальное внимание уделено анализу имеющейся в литературе информации о фотосенсибилизующих свойствах птеринов, рибофлавина и протопорфирина IX с характерными особенностями действия каждого из этих сенсибилизаторов. На основании данных, полученных при изучении модельных систем, птерины и рибофлавины можно рассматривать как потенциальные фотосенсибилизаторы повреждения ДНК в клетках, однако прямые доказательства этого пока отсутствуют. Что касается протопорфирина IX и его производных, то, как показано, они могут действовать в клеточных структурах как фотосенсибилизаторы окислительных процессов, индуцирующих цитотоксические эффекты.

Механизмы фотохимических реакций в ДНК клеток проанализированы в связи с вопросом о роли различных УФ-индуцированных повреждений в мутагенезе и канцерогенезе кожи человека. Результаты исследований последнего времени свидетельствуют, что УФВ и УФА вызывают разные типы и количества дефектов в ДНК меланоцитов и кератиноцитов и этим можно объяснить различия в спектрах мутаций у меланом и карцином. Из сравнительного определения дефектов в ДНК, индуцированных УФВ или УФА в меланоцитах и кератиноцитах человека, следует, что продукты окислительных реакций, формируемые при облучении УФА, вносят больший вклад в повреждение ДНК меланоцитов, чем в повреждение ДНК кератиноцитов, и это может быть связано с фотосенсибилизующей активностью пигмента меланина, образующегося в меланоцитах. О важной роли меланина в индукции меланомы при облучении меланоцитов УФА свидетельствуют данные, согласно которым для формирования в ДНК 8-oxodG и последующего возможного образования GC→TA-трансверсий требуется присутствие пигмента меланина в меланоцитах. В противоположность этому, действие УФВ инициирует развитие меланомы из беспигментных меланоцитов и связано с прямым формированием CPDs в ДНК. Значительный интерес вызывают недавние сообщения о возникновении в ДНК кератиноцитов под действием УФА1 задержанных во времени «темновых» CPDs и окисленных фотопродуктов, в основе формирования которых могут лежать фотоокислительные реакции. Аналогичные результаты по-

лучены недавно при воздействии УФА на меланоциты человека, содержащие пигмент меланин, который, как предполагается, участвует в окислительном процессе формирования «темновых» CPDs. Согласно выдвинутой гипотезе, этот процесс связан с химическим возбуждением карбонилов, образующихся при распаде нестабильных оксетанов, и триплет-триплетным переносом энергии от карбонилов к пиримидиновым основаниям ДНК. Раскрытие молекулярных механизмов фотосенсибилизирующей активности меланина и его вовлечения в химическое возбуждение

компонентов окислительных реакций, инициирующих формирование «темновых» CPDs, представляется важным в аспекте совершенствования способов защиты от канцерогенного действия на кожу человека УФ-излучения разных длин волн.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baptista M.S., Cadet J., Greer A., Thomas A.H. Photosensitization reactions of biomolecules: definition, targets and mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 2021;97(6):1456–1483.
2. Pfeifer G.P., Besaratinia A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012;11(1):90–97.
3. Fraikin G.Ya., Belenikina N.S., Rubin A.B. Damaging and defense processes induced in plant cells by UVB radiation. *Biol. Bull.* 2018;45(6):519–527.
4. Markovitsi D., Sage E., Lewis F.D., Davies J. Interaction of UV radiation with DNA. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013;12(8):1256–1258.
5. Cadet J., Douki T. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018;17(12):1816–1841.
6. Mullenders L.H.F. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018;17(12):1842–1852.
7. Johann to Berens P., Molinier J. Formation and recognition of UV-induced DNA damage within genome complexity. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(18):6689.
8. Frances-Monerris A., Hognon C., Miranda M.A., Lhiaubet-Vallet V., Monari A. Triplet photosensitization mechanism of thymine by an oxidized nucleobase: from a dimeric model to DNA environment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018;20(40):25666–25675.
9. Gontcharov J., Liu L., Pilles B.M., Carell T., Schreier W.J., Zinth W. Triplet-induced lesion formation at CpT and TpC sites in DNA. *Chem. Eur. J.* 2019;25(66):15164–15172.
10. Laustriat G. Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie.* 1986;68(6):771–778.
11. Baptista M.S., Cadet J., Di Mascio P., Ghogare A.A., Greer A., Hamblin M.R., Lorente C., Nunez S.C., Ribeiro M.S., Thomas A.H., Vignoni M., Yoshimura T.M. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. *Photochem. Photobiol.* 2017;93(4):912–919.
12. Krasnovsky A.A., Jr. Photodynamic action and singlet oxygen. *Biophysics.* 2004;49(2):289–306.
13. Fraikin G.Ya. Photosensory and signaling properties of cryptochromes. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;71(2):54–63.
14. Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes. *Biochemistry (Mosc.)*. 2013;78(11):1238–1253.
15. Vechtomova Y.L., Telegina T.A., Kritsky M.S. Evolution of proteins of the DNA photolyase/cryptochrome family. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(Suppl.1):S131–S153.
16. Fuentes-Lemus E., Mariotti M., Reyes J., Leinisch F., Hagglund P., Silva E., Davies M.J., Lopez-Alarcon C. Photooxidation of lysozyme triggered by riboflavin is O₂-dependent, occurs via mixed type I and type 2 pathways, and results in inactivation, site-specific damage and intra- and inter-molecular cross-links. *Free. Radic. Biol. Med.* 2020;152:61–73.
17. Perrier S., Hau J., Gasparutto D., Cadet J., Favier A., Ravanat J.-L. Characterization of lysine-guanine cross-links upon one-electron oxidation of a guanine-containing oligonucleotide in the presence of a trylisine peptide. *J. Am. Chem. Soc.* 2006;128(17):5703–5710.
18. Chan C.H., Monari A., Ravanat J.-L., Dumont E. Probing interaction of a trylisine peptide with DNA underlying formation of guanine-lysine cross-links: Insights from molecular dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019;21(42):23418–23424.
19. Di Mascio P., Martinez G.R., Miyamoto S., Ronsein G.E., Medeiros M.H.G., Cadet J. Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins. *Chem. Rev.* 2019;119(3):2043–2086.
20. Ravanat J.-L., Dumont E. Reactivity of singlet oxygen with DNA, an update. *Photochem. Photobiol.* 2022;98(3):564–571.
21. Girotti A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2001;63(1–3):103–113.
22. Oliveros E., Dantola M.L., Vignoni M., Thomas A.H., Lorente C. Production and quenching of reactive oxygen species by pterin derivatives, an intriguing class of biomolecules. *Pure Appl. Chem.* 2011;83(4):801–811.
23. Buglak A.A., Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. Photooxidation of tetrahydrobiopterin under UV irradiation: possible pathways and mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 2014;90(5):1017–1026.
24. Buglak A.A., Telegina T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. Autooxidation and photooxidation of tetrahydrobiopterin: a theoretical study. *Free Radic. Res.* 2021;55(5):499–509.

25. Thomas A.H., Lorente C., Capparelli A.L., Martinez C.G., Braun A.M., Oliveros E. Singlet oxygen ($^1\Delta_g$) production by pterin derivatives in aqueous solutions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2003;2(3):245–250.
26. Lorente C., Serrano M.P., Vignoni M., Dantola M.L., Thomas A.H. A model to understand type I oxidations of biomolecules photosensitized by pterins. *J. Photochem. Photobiol.* 2021;7:100045.
27. Serrano M.P., Lorente C., Vieyra F.E.M., Borsarelli C.D., Thomas A.H. Photosensitizing properties of biopterin and its photoproducts using 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate as an oxidizable target. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012;14(33):11657–11665.
28. Serrano M.P., Lorente C., Borsarelli C.D., Thomas A.H. Unraveling the degradation mechanism of purine nucleotides photosensitized by pterins: the role of charge-transfer steps. *ChemPhysChem.* 2015;16(10):2244–2252.
29. Serrano M.P., Vignoni M., Lorente C., Vicendo P., Oliveros E., Thomas A.H. Thymidine radical formation via one-electron transfer oxidation photoinduced by pterin: mechanism and products characterization. *Free Radic. Biol. Med.* 2016;96:418–431.
30. Estebanez S., Lorente C., Tosato M.G., Miranda M.A., Marin M.L., Lhiaubet-Vallet V., Thomas A.H. Photochemical formation of a fluorescent thymidine–pterin adduct in DNA. *Dyes Pigm.* 2019;160:624–632.
31. Cadet J., Douki T., Ravanat J.-L. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* 2015;91(1):140–155.
32. Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H., Di Mascio P., Wagner J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;107:13–34.
33. Shumarina A.O., Strakhovskaya M.G., Turovetskii V.B., Fraikin G.Ya. Photodynamic damage to yeast subcellular organelles induced by elevated levels of endogenous protoporphyrin IX. *Microbiology.* 2003;72(4):434–437.
34. Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996;34(2–3):129–135.
35. Strakhovskaya M.G., Shumarina A.O., Fraikin G.Ya., Rubin A.B. Fluorescence photobleaching of endogenous protoporphyrin IX in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biophysics.* 2002;47(5):791–796.
36. Blair I.A. DNA adducts with lipid peroxidation products. *J. Biol. Chem.* 2008;283(23):15545–15549.
37. Selby C.P., Lindsey-Boltz L.A., Li W., Sancar A. Molecular mechanisms of transcription-coupled repair. *Annu. Rev. Biochem.* 2023;92:115–144.
38. Panigrahi A., Vemuri H., Aggarwal M., Pitta K., Krishnan M. Sequence specificity, energetic and mechanism of mismatch recognition by DNA damage sensing protein Rad4/XPC. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(5):2246–2257.
39. Xu J., Lahiri I., Wang W., Wier A., Cianfrocco M.A., Chong J., Hare A.A., Dervan P.B., DiMaio F., Leschziner A.E., Wang D. Structural basis for the initiation of eukaryotic transcription-coupled DNA repair. *Nature.* 2017;551(7682):653–657.
40. Mei Kwei J.S., Kuraoka I., Horibata K., Ubukata M., Kobatake E., Iwai S., Handa H., Tanaka K. Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;320(4):1133–1138.
41. Brueckner F., Hennecke U., Carell T., Cramer P. CPD damage recognition by transcribing RNA polymerase II. *Science.* 2007;315(5813):859–862.
42. Walmacq C., Cheung A.C.M., Kireeva M.L., Lubkowska L., Ye C., Gotte D., Strathern J.N., Carell T., Cramer P., Kashlev M. Mechanism of translesion transcription by RNA polymerase II and its role in cellular resistance to DNA damage. *Mol. Cell.* 2012;46(1):18–29.
43. Tkachev V., Menshchikova E., Zenkov N.K. Mechanism of the Nrf2/Keap 1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc.)* 2011;76(4):407–422.
44. Tekutskaya E.E., Il'chenko G.P., Dorohova A.S., Malysheko V.V., Baryshev M.G., Dzhimak S.S. 8-Oxoguanine-DNA-glycosylase gene polymorphism and the effects of an alternating magnetic field on the sensitivity of peripheral blood. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 2023;28(10):252.
45. Tewari A., Grage M.M.L., Harrison G.I., Sarkany R., Young A.R. UVA1 is skin deep: molecular and clinical implications. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013;12(1):95–103.
46. Halliday G.M., Cadet J. It's all about position: the basal layer of human epidermis is particularly susceptible to different types of sunlight-induced DNA damage. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132(2):265–267.
47. Delinasios G.J., Karbaschi M., Cooke M.S., Young A.R. Vitamin E inhibits the UVA1 induction of "light" and "dark" cyclobutane pyrimidine dimers, and oxidatively generated DNA damage, in keratinocytes. *Sci. Rep.* 2018;8(1):423.
48. Lawrence K.P., Douki T., Sarkany R.P.E., Acker S., Herzog B., Young A.R. The UV/Visible radiation boundary region (385–405 nm) damages skin cells and induces "dark" cyclobutane pyrimidine dimers in human skin *in vivo*. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12722.
49. Mouret S., Forestier A., Douki T. The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012;11(1):155–162.
50. Noonan F., Zaidi M.R., Wolnicka-Glubisz A., Anver M.R., Bahn J., Wielgus A., Cadet J., Douki T., Mouret S., Tucker M.A., Popratiloff A., Merlino G., De Fabo E.C. Melanoma induction by UVA but not UVB radiation requires melanin. *Nat. Commun.* 2012;3(1):884.
51. Premi S., Wallisch S., Mano C.M., Weiner A.B., Bacchiocchi N., Wakamatsu K., Bechara E.J., Halaban R., Douki T., Brash D.E. Photochemistry. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science.* 2015;347(6224):842–847.
52. Premi S., Brash D.E. Chemical excitation of electrons: a dark path to melanoma. *DNA Repair (Amst.)* 2016;44:169–177.
53. Premi S., Brash D.E. Unanticipated role of melanin in causing carcinogenic cyclobutane pyrimidine dimers. *Mol. Cell. Oncol.* 2016;3(1):e1033588.
54. Fajuyigbe D., Douki T., van Dijk A., Sarkany R.P.E., Young A.R. Dark cyclobutane pyrimidine dimers are formed in the epidermis of Fitzpatrick skin types I/II and VI *in vivo* after exposure to solar-simulated radiation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021;34(3):575–584.

Поступила в редакцию 10.04.2024

После доработки 28.08.2024

Принята в печать 03.10.2024

REVIEW

Photosensitized reactions of oxidative damage to biomolecules: role in genotoxic and cytotoxic processes

G.Ya. Fraikin 

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

Photosensitized oxidation reactions of biomolecules such as lipids, proteins, DNA initiate cytotoxic and genotoxic processes that are mediated by endogenous sensitizers under effect of ultraviolet radiation in the range A (UVA, 320–400 nm) on living systems. The photosensitization reactions are oxygen-dependent and depending upon primary mechanism are divided into type I and type II. Type I reactions involve electron transfer between photoexcited sensitizer and biomolecule with the formation of radical states. The interaction of radical cation of biomolecule with oxygen leads to the production of its final oxidation products, and electron transfer between radical anion of sensitizer and oxygen generates superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) with following production of H_2O_2 and the highly reactive hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$). In contrast to radical mechanism of type I reactions, primary mechanism of type II reactions involves energy transfer from photoexcited sensitizer to oxygen (O_2) that leads to the formation of singlet oxygen (1O_2 , $^1\Delta_g$), which is much more reactive in relation to biomolecule oxidation than O_2 . Current knowledge on mechanisms of initial stages of the type I and type II reactions as well as their involvement in the oxidized degradation of biomolecules such as DNA, proteins and lipids are expounded in detail in present review. Sensitized properties of pterins, riboflavin and protoporphyrin IX with characteristic peculiarities of action of each of these photosensitizers are also considered. The considerable attention is given to processes of photosensitized damage to DNA and discussing the role of different DNA photoproducts in initiating genotoxic processes including carcinogenesis in human skin.

Keywords: *photosensitized reactions, oxidized degradation of biomolecules, DNA photoproducts, genotoxic processes, cellular photosensitizers, UVA photons*

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

Сведения об авторе

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 591.88

Морфологические особенности иннервации органов средостения крысы в разные сроки постнатального онтогенеза**Е.И. Чумасов^{1, 2 *} , Е.С. Петрова¹ , Д.Э. Коржевский¹ **¹*Отдел общей и частной морфологии, Институт экспериментальной медицины, Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12;*²*Кафедра биологии, экологии, гистологии, Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия, 196084, г. Санкт-Петербург, ул. Черниговская, д. 5***e-mail: ua1ct@mail.ru*

Актуальность изучения нервных аппаратов жизненно важных органов средостения в период раннего постнатального онтогенеза обусловлена особенностями периода рождения, когда происходит переключение процесса кровообращения с плацентарного на легочное, и периода первых дней развития, когда наблюдается становление регуляции дыхания и функционирования органов сердечно-сосудистой системы. Цель настоящего исследования состояла в сравнительном изучении особенностей иннервации органов средостения крысы и выяснении межорганных и нервно-тканевых взаимоотношений в ранний постнатальный период онтогенеза. Объектами исследования служили фронтальные срезы через сердечно-легочный комплекс крыс в возрасте 1, 7, 10 и 14 сут. Нервные структуры средостения изучали с применением нейроиммуногистохимических маркеров: белка PGP 9.5, тирозингидроксилазы, синаптофизина. Исследование нервных аппаратов органов средостения (сердца, бронхов, пищевода, аорты, легочной артерии, жировой ткани и др.) показало, что в ранние сроки развития в средостении преобладающими являются холинергические структуры. С помощью нейроиммуногистохимических методов выявлена гетерохронность развития основной терминальной синаптической сети. Описана высокая концентрация нервных структур в проводящем миокарде венозного синуса и в пучке Гиса, а также в межмышечном сплетении пищевода и гладких мышцах трахеи, у крыс в возрасте 1 и 7 сут развития с преобладанием парасимпатической иннервации. На 10 и 14 сут отмечены повсеместный поверхностный активный рост нервных волокон по всему периметру органа вплоть до его вершины и начало формирования его основных нервных сплетений: субэпикардального, миокардального и эндокарда.

Ключевые слова: органы средостения крысы, иннервация, бронхи, пищевод, проводящий миокард, иммуногистохимия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-2

Введение

Морфологическому изучению иннервации органов средостения (mediastinum) млекопитающих уделяется внимание в течение не одного десятилетия. Анатомо-топографическими методами выделяют различные отделы средостения: верхний, средний и нижний, а также краниальный и каудальный, вентральный и дорсальный [1, 2]. В верхнем и среднем средостении находятся такие органы, как бронхи, пищевод, стволы аорты и легочной артерии, лимфатические узлы, полые и легочные вены, дольки жировой ткани, в нижнем — сердце. Ранее большое внимание уделялось изучению вопросов иннервации магистральных кровеносных сосудов малого и большого кругов

кровообращения (стволов аорты, легочных и коронарных артерий, полых и легочных вен, самого сердца) [3–6]. Все эти органы, как известно, локализованы в грудной клетке и являются структурными компонентами средостения. В околосердечной области с помощью нейрогистологических и гистохимических методов, а также электронной микроскопии ранее описано большое многообразие нервных структур: ганглиев, параганглиев, нервных сплетений, миелинизированных и немиелинизированных нервных проводников [1]. В последние годы для изучения морфофункциональных особенностей нервных аппаратов органов сердечно-сосудистой, дыхательной и пищеварительной систем широко применяются

иммуногистохимические методы (ИГХ-методы) выявления селективных белков, свойственных различным структурным элементам нервной системы [5–9]. Следует отметить, что менее изученной по сравнению с иннервацией сердца и магистральных сосудов остается иннервация других жизненно важных органов средостения: пищевода, легочных и полых вен, бронхов, долек жировой ткани. Согласно анатомо-топографическим наблюдениям, органы в средостении объединены между собой интерстициальной соединительной тканью, в состав которой входят сосуды гемокроциркуляторного русла, жировая ткань и лимфатические узелки, имеющие общие источники иннервации и кровоснабжения с сердцем. Анализ литературы свидетельствует о недостаточности фундаментальных знаний о динамике развития иннервации органов средостения в норме, при патологии и в онтогенезе. Имеются лишь единичные работы. Актуальность изучения развития нервных аппаратов таких жизненно важных органов, локализованных в средостении, как сердце, пищевод, трахея и др., в период раннего постнатального развития обусловлена особенностями периода рождения, когда происходит переключение процесса кровообращения с плацентарного на легочное, и периода первых дней развития, когда наблюдается становление регуляции дыхания и функционирования органов сердечно-сосудистой системы. Практически отсутствуют работы, посвященные комплексному морфологическому изучению органов средостения с помощью ИГХ-методов. Цель настоящего исследования состояла в сравнительном изучении особенностей иннервации органов средостения лабораторной крысы и выяснении межорганных и нервно-тканевых взаимоотношений в ранний постнатальный период онтогенеза.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах Вистар ($n = 24$). Животных раннего возраста получали после подсадки половозрелых самок к самцам (3:1) по общепринятому методу разведения лабораторных животных [10]. Новорожденные крысы в течение всего периода наблюдений находились вместе с матерью. Животные содержались в пластиковых клетках при обычном 12-часовом световом режиме на стандартной диете при свободном доступе к воде и корму. В эксперименте использовали молодых крыс обоего пола. На разных этапах постнатального развития (через 1 сут, 7 сут, 10 сут, 14 сут после рождения) у животных выделяли область средостения. При работе с животными соблюдали международные правила Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (ETS 123, Страсбург, 1986), и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU, Страсбург,

2010). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022). Животных выводили из эксперимента путем передозировки наркоза (пары этилового эфира).

Для фиксации материала использовали раствор «цинк-этанол-формальдегид» — специальный фиксатор, применяющийся для дальнейшего проведения иммуногистохимических реакций (ИГХ-реакций) на парафиновых срезах [11]. Гистологический материал фиксировали в течение 1 сут и после соответствующей обработки заливали в парафин. На срезах толщиной 5–7 мкм проводили ИГХ-реакции на ряд нейральных маркеров. Для идентификации катехоламинергических структур использовали кроличьи поликлональные антитела к тирозингидроксилазе (ТГ; Abcam, Великобритания). Для выявления белка PGP 9.5 использовали поликлональные кроличьи антитела (Spring Bioscience, США). Синаптофизин-содержащие структуры визуализировали с помощью поликлональных кроличьих антител (MONOSAN, Нидерланды). Первичные антитела в нужном разведении наносили на гистологические срезы после депарафинирования на 1 сут. В качестве вторичных реагентов использовали реактивы из набора Reveal Polyvalent HRP / DAB Detection System kit (Spring Bioscience, США) и набор UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США). Поскольку в работе использовались антитела одного источника происхождения — кроличьи (к белку PGP 9.5 и к ТГ), проводилось не двойное маркирование, а сопоставление последовательных серийных срезов с разными ИГХ-реакциями. Метод описан в патенте на изобретение Чумасова Е.И. и др. (Патент на изобретение RU 2657787 C1, 15.06.2018). Часть срезов подкрашивали толуидиновым синим и астровым синим. Для измерения размеров клеток применяли программу LAS EZ (Leica, Германия). Для осуществления отрицательного контроля ИГХ-реакций на часть срезов вместо раствора первичных антител наносили их разбавитель (Agilent, США). Анализ гистологических препаратов осуществляли с помощью микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) и цифровой камеры Leica ICC 50 (Leica, Германия).

Результаты

Гистологический анализ препаратов средостения на всех сроках исследования показал, что на продольных срезах можно видеть большинство органов средостения: фрагменты пищевода, лимфатических узлов, ганглиев, стволы вагосимпатических нервов, главные бронхи, магистральные венозные и артериальные сосуды, сердце. Между органами располагается рыхлая соединительная ткань, содержащая сосуды микроциркуляторного русла, и развивающиеся дольки жировой ткани.

В разных участках соединительной ткани встречаются нервные структуры (ганглии, нервные сплетения, нервные волокна) как холинергической (ТГ-имунонегативные), так и симпатической (ТГ-иммунопозитивные) природы. В некоторых нервных пучках наблюдали группы парасимпатических нервных клеток и прилежащие к ним группы нейросекреторных клеток симпатoadреналовой системы — хромаффинных клеток (ХК) (рис. 1).

Нервные сплетения в средостении новорожденной крысы прослеживаются между органами, тесно прилежат к ним и, таким образом, объединяют их друг с другом в структурном и функциональном отношении (рис. 1).

У крыс P7 процессы развития иннервации органов средостения продолжают. Они характеризуются увеличением плотности различного типа (широкопетлистых и узкопетлистых) нервных сплетений, увеличением размеров и количества нервных элементов за счет дифференцировки нейробластов в молодые и зрелые нейроны (в ганглиях). Нейробласты и молодые нейроны ганглиев определяли с помощью гистохимической окраски толуидиновым синим по Ниссю и ИГХ-реакции на PGP 9.5 по их морфологическим признакам: размерам (диаметр нервных клеток варьировал от 20 до 40 мкм — у крыс на 1-е сут после рождения, и доходил до 40–50 мкм — у крыс на 7-е–10-е сут), наличию отростков и хромотофильной субстанции в цитоплазме. Пучки широкопетлистых сплетений, состоящие, как правило, из проводниковых немиелинизированных и миелинизированных нервных волокон, переходят в узкопетлистые, так называемые «основные терминальные синаптические сети» из варикозных аксонов, известных как дистантные синапсы *en passant*. Высокой интенсивности терминальная синаптическая сеть парасимпатических варикозных аксонов была выявлена в так называемом синусном узле (*sinus nodosum*) с помощью ИГХ-реакции на белок PGP 9.5 и синаптофизин. Синусный узел обнаружен в миокарде, между крапильной полостью веной и основанием ушка правого предсердия. Эта область анатомически соответствует «венозному синусу», где объединяются крапильная и каудальная полые вены, приносящие венозную кровь в правое предсердие. На рис. 2 можно видеть структуры синусного узла: фрагменты атриального ганглия, многочисленные пучки нервных волокон, кардиомиоциты проводящего миокарда, а также узкопетлистая сеть из PGP 9.5-иммунопозитивных парасимпатических варикозных аксонов (рис. 2Б). При больших увеличениях видно, что тонкие веточки варикозных аксонов тесно прилежат к телам крупных специализированных клеток цилиндрической формы с большим объемом светлой цитоплазмы, овальными ядрами и невыраженной поперечной исчерченностью. По морфологическим признакам они представляют собой типичные клетки «проводящего миокарда».

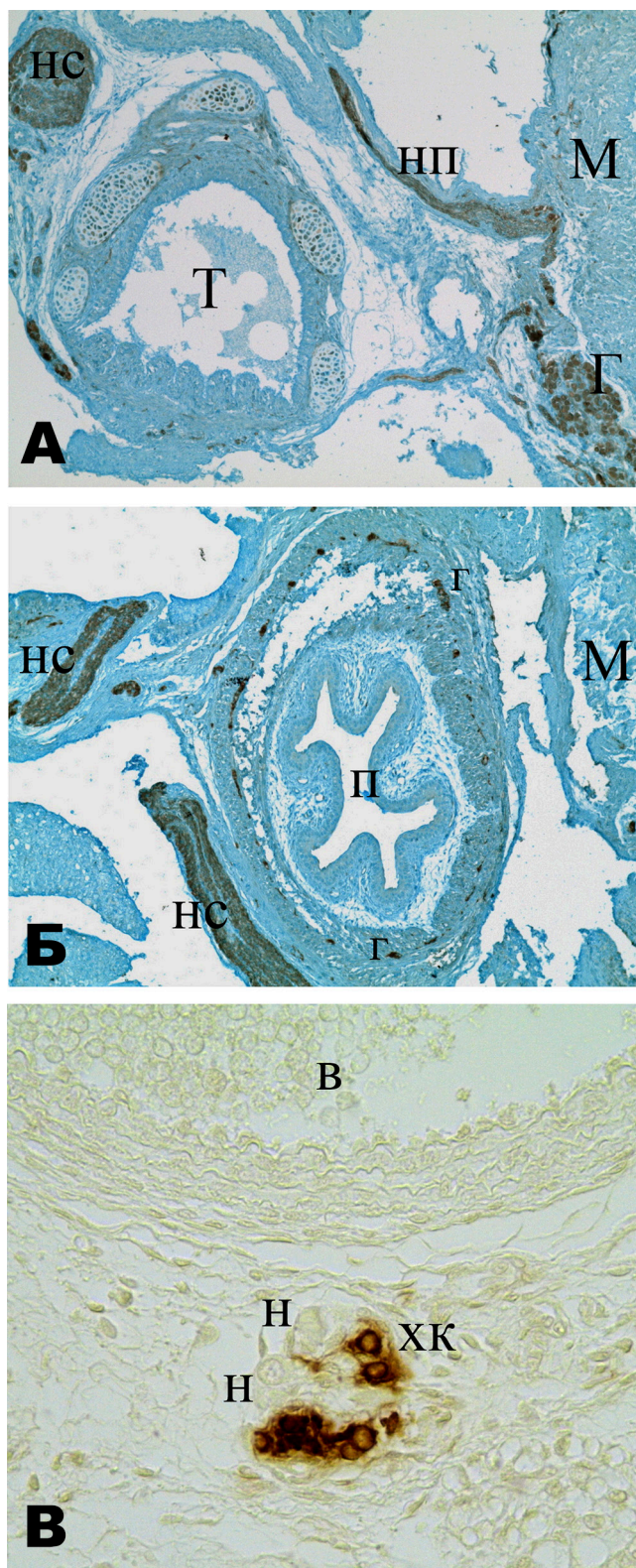


Рис. 1. Ганглионарные сплетения внутри и между органами средостения крысы на 1 сут постнатального развития. А — нервные структуры бронхов и сердца; Б — нервные структуры пищевода; В — группа хромаффинных и нервных клеток в соединительной ткани средостения вблизи с большим венозным сосудом. П — пищевод; Т — трахея; М — миокард предсердий; НС — нервные стволы; НП — нервные пучки; г — ганглиозное нервное сплетение Ауэрбаха и атриального ганглия; В — вена; Н — нейроны; ХК — хромаффинные клетки. Иммуногистохимические реакции на белок PGP 9.5 (А, Б) и тирозингидроксилазу (В). Увеличение: $\times 100$ (А, Б); $\times 400$ (В).

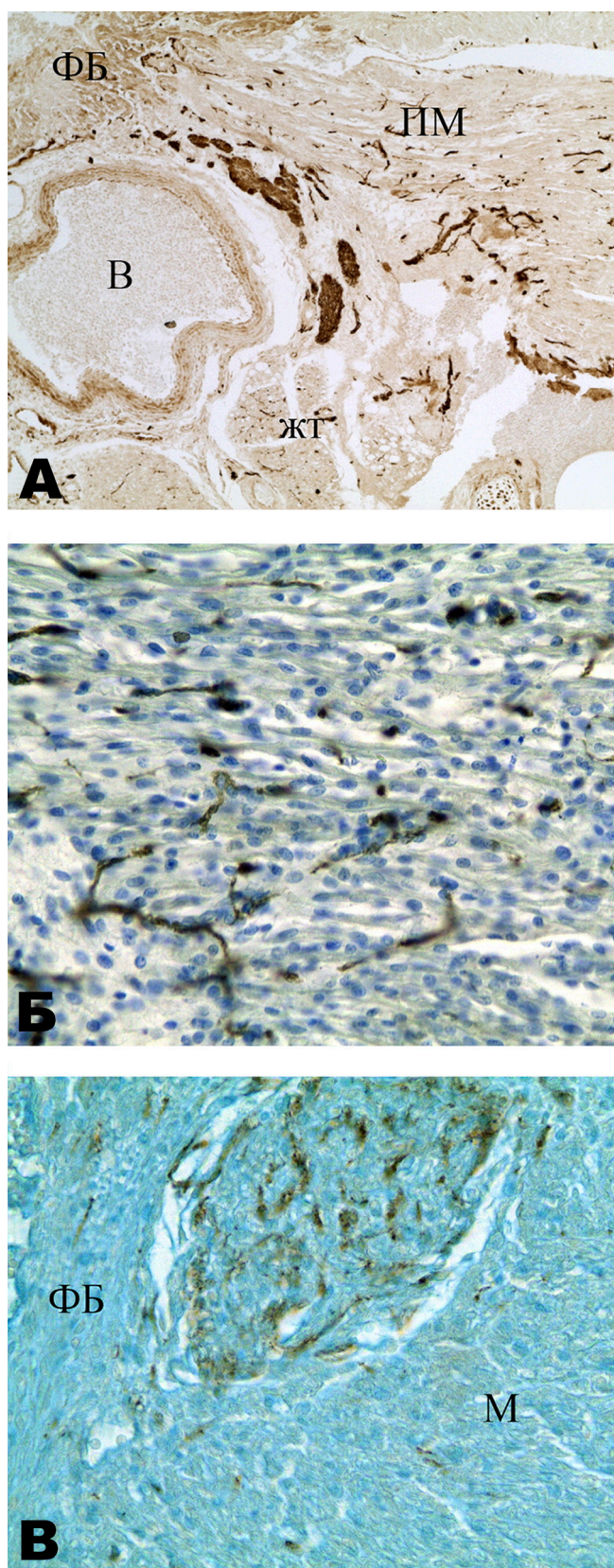


Рис. 2. Фрагменты ганглия и нервные сплетения в области венозного синуса крыс в возрасте 7 сут. **А** — общий вид; **Б** — фрагмент из **А**; **В** — пучок Гиса на границе миокарда и фиброзной ткани. М — миокард; ФБ — фиброзная ткань; ЖТ — дольки развивающейся жировой ткани; В — полая вена; ПМ — проводящий миокард. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5, подкраска толуидиновым синим (**Б**) и альциановым синим (**В**). Увеличение: $\times 100$ (**А**), $\times 1000$ (**Б**), $\times 400$ (**В**).

Визуальная оценка авторами наличия или отсутствия PGP 9.5-иммунопозитивных структур или ТГ-иммунопозитивных структур может свидетельствовать о том, что бо́льшая часть нервных терминалей является парасимпатическими, а меньшая — симпатическими. Терминальная сеть, иннервирующая проводящий миокард стенки венозного синуса, прослеживается на значительном протяжении от фиброзной ткани до разветвлений на отдельные пучки. На рис. 2В представлен пучок Гиса в месте проникновения через ткань фиброзного кольца в миокард правого желудочка.

Терминальные синаптические сети, состоящие из варикозных аксонов, встречаются на данном сроке (P7) также в адвентиции главных бронхов, трахеи, вокруг мелких артерий и артериол, в эпителиоморфных тельцах и дольках бурой и белой жировой ткани (рис. 2А). В структурах стенки пищевода, кроме ганглиозного сплетения Ауэрбаха, выявляются также фрагменты пучков терминальной сети варикозных аксонов во всех оболочках, что свидетельствует о раннем функциональном развитии иннервации этого отдела желудочно-кишечного тракта.

У крыс в возрасте 7 сут резко возрастает уровень дифференцировки парасимпатических нервных узлов средостения. Ганглии увеличиваются в размерах, их нейроны приобретают дефинитивный вид, а отростки формируют пучки постганглионарных нервных волокон. Следует отметить, что внутри некоторых ганглиев и отходящих от них ветвей встречаются и пучки симпатических волокон, которые проходят через ганглии транзитно и предположительно связаны с кровеносными сосудами (рис. 3).

Таким образом, у крыс в возрасте 7 сут наблюдаются интенсификация развития нервных волокон и нервных сплетений, дифференцировка нейронов. Начиная с этого срока, в перибронхиальной и аортально-пульмональной зонах заметно возрастает число ветвей симпатической цепочки и включенных в них групп ХК. Неожиданным стал факт обнаружения в симпатических стволиках и пучках достаточно больших групп молодых парасимпатических нейроцитов, иммунонегативных к маркеру PGP 9.5 (рис. 3В). Одновременно с этим отмечается тенденция направленного роста пучков нервных волокон от нервных сплетений и ганглиев нижнего отдела средостения к тканям сердца.

Начиная с 10 сут после рождения, прослеживается эпикардиальный рост тончайших пучков аксонов от ганглиозного широкопетлистого сплетения вдоль поверхности сердца. В субэпикардиальной области предсердий в этот срок часто видны тончайшие пучки PGP 9.5-иммунопозитивных нервных волокон, расположенные между однослойным плоским эпителием проэпикарда и дифференцирующимися клетками миокарда (рис. 5В).

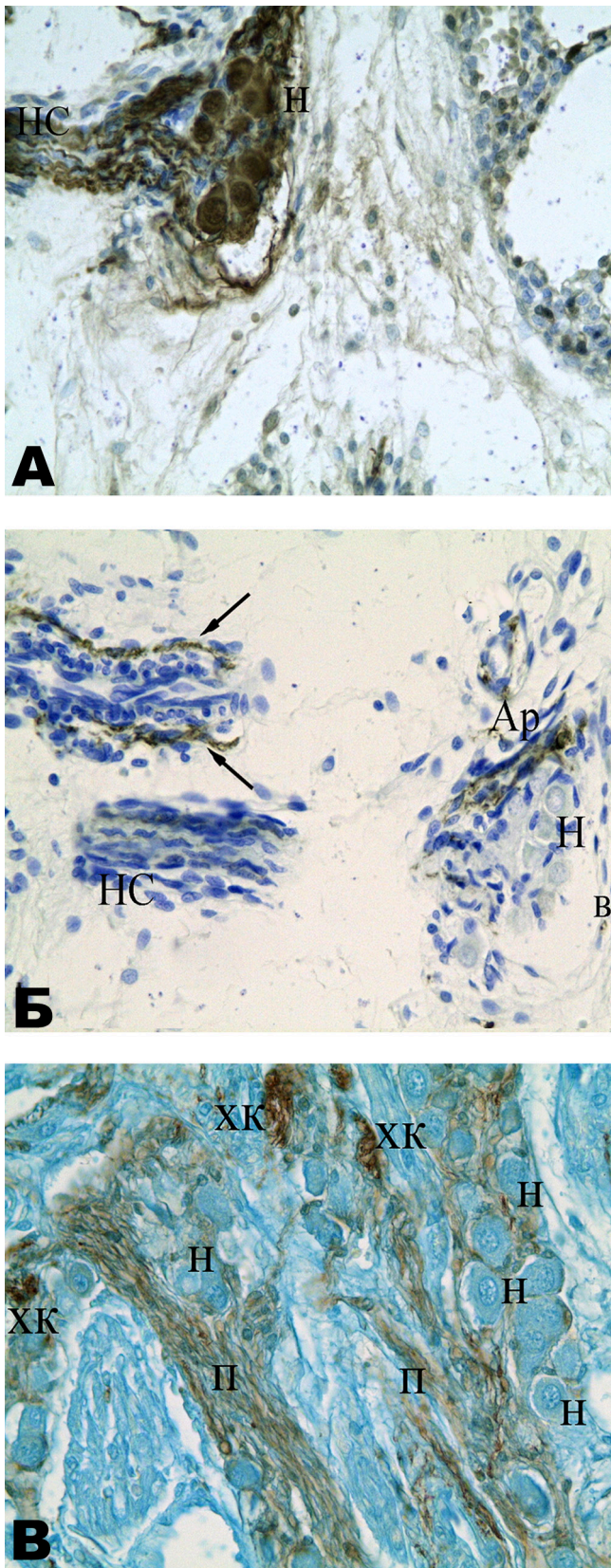


Рис. 3. Парасимпатический ганглий в средостении крысы в возрасте 7 сут (А, Б) и P10 (В). Н — нейроны; HC — нервный ствол; Ар — артериола; ↑↑ — транзитные симпатические волокна; В — вена; XK — хромаффинные клетки; П — сеть из пучков нервных волокон. Иммуногистохимические реакции на белок PGP 9.5 (А) и тирозингидроксилазу (Б, В). Подкраска толуидиновым синим (А, Б) и астровым синим (В). Увеличение: ×400.

Признаками незрелости миокарда служат наличие в нем многочисленных мышечных трубочек, большого числа митозов, конусов роста. Часть растущих пучков нервных волокон встречается также в верхнем отделе межжелудочковой перегородки в основании клапанного аппарата в области фиброзного кольца.

У крыс в возрасте 14 сут заметно визуализируется рост пучков нервного сплетения в различных отделах сердца. При этом диаметр пучков в нем заметно увеличивается за счет развития аксоглияльных (нейроглияльных) взаимоотношений. Нервные волокна состоят из проводников разной медиаторной природы (парасимпатические и симпатические), их аксоны заключены в синцитий-подобные тяжи нейролеммоцитов. Последние легко определялись при окраске препаратов толуидиновым синим по характерным вытянутым ядрам и локализации вблизи аксонов. На этом сроке онтогенеза проявляются четкие признаки развития нервных сплетений в разных отделах сердца. На поперечных срезах по всему периметру органа, вплоть до его вершины, встречаются пучки нервных волокон, свидетельствующие об образовании вокруг сердца субэпикардального широкопетлистого поверхностного сплетения. В этот же период часто наблюдаются картины прорастания терминальных варикозных аксонов, от субэпикардального сплетения и от периваскулярной нервной сети коронарных артерий в глубокие слои миокарда (рис. 4). В результате образуется второе — внутреннее, трехмерное миокардиальное сплетение. В последнюю очередь формируется эндокардиальное нервное сплетение.

На рис. 5 представлен сравнительный анализ иннервации миокарда левого желудочка крысы в возрасте 1 сут, 7 сут и 10 сут. На 1-е сут после рождения видны только пучки поверхностного субэпикардального сплетения, а на P7 и P10 уже можно видеть фрагменты формирующейся узкопетливой терминальной сети в миокарде левого желудочка.

На 10-е и 14-е сут после рождения заметно возрастает и становится более очевидной степень иннервации остальных органов средостения, включая бронхиальные ветви долевых и сегментных отделов легкого (рис. 4Б).

Обсуждение результатов

Исследования, выполненные с помощью физиологических и клинко-анатомических методов, показали, что ветви стволов блуждающих, диафрагмальных, возвратных нервов и нервов симпатической цепочки образуют в грудной полости несколько нервных сплетений: грудное аортальное, сердечное, легочное и пищеводное [12–17]. Каждое из них может представлять выраженную рефлексогенную зону, раздражение которой ведет к нарушению функции тех или иных органов грудной

полости. Данные нашего морфофункционального исследования, с одной стороны, подтверждают эти факты, а с другой — показывают, что органы средостения объединены между собой не только фасцикулярной соединительной тканью, но и нейронными тесными связями. По данным клиницистов и физиологов, раздражение, например, пищеводного сплетения влияет на функцию сердца и легких, вызывая ответные реакции: в одних случаях — кашель, в других — изменение частоты сердечного ритма. В связи с этим ранения грудной клетки часто сопровождаются выраженными болевыми ощущениями и шоком. Полагают, что нервные сплетения в средостении представляют собой рефлексогенные зоны грудной полости, сходные с синокаротидной зоной. Морфологических работ, посвященных исследованию иннервации органов средостения в раннем постнатальном периоде развития, мало. В основном, они касаются иннервации сердца [3–5].

В настоящем исследовании была прослежена динамика и последовательность образования нервных сплетений в разных отделах средостения, в том числе в сердце, у крыс в возрасте от 1 сут до 14 сут развития. Макроскопически с помощью ИГХ-методов в средостении у новорожденных, начиная с 1-х и 7-х сут после рождения, выявляются многочисленные парасимпатические крупные ганглии и микроганглии, пучки нервных волокон, состоящие из различных отделов периферической нервной системы. Они формируют разной плотности широкопетлистые сплетения из пучков нервных волокон парасимпатической и симпатической природы. Нервные волокна сплетений, локализующиеся вокруг органов средостения, по нашему мнению, объединяют их в структурном и функциональном отношении. Стволики и пучки нервных волокон выявлены в области полых вен, между аортой

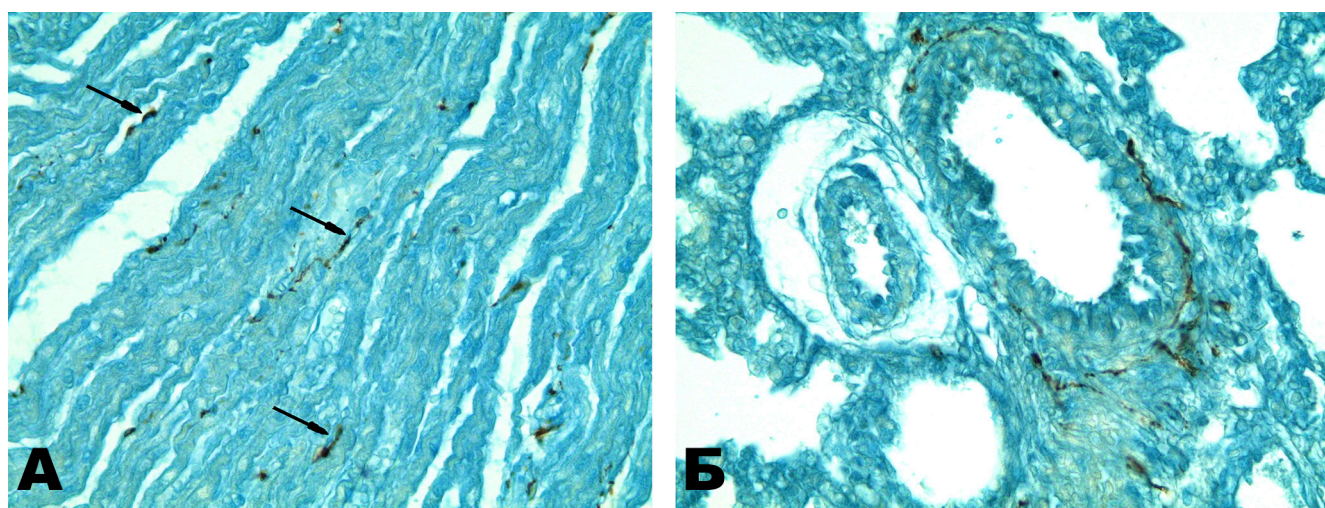


Рис. 4. Нервные аппараты в миокарде левого желудочка сердца (А) и вокруг бронха в легком (Б) крысы на 14-е сут после рождения. Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин. Подкраска астровым синим. Увеличение $\times 100$ (А); $\times 400$ (Б).

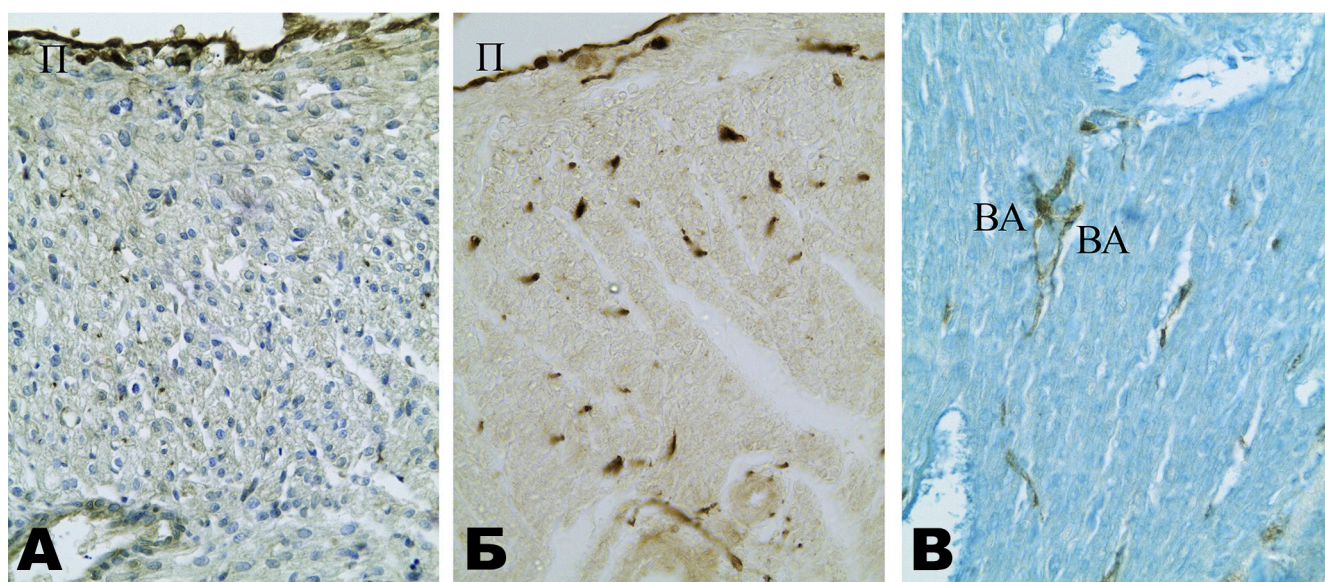


Рис. 5. Динамика изменения иннервации миокарда левого желудочка сердца крысы на 1-е (А), 7-е (Б) и 10-е (В) сут после рождения. П — проэпикард; ВА — варикозные аксоны. Иммуногистохимическая реакция на белок PGP 9.5. Подкраска толуидиновым синим (А) и астровым синим (Б). Увеличение: $\times 400$

и легочным стволом, на границе атриовентркулярной поверхности задней стенки миокарда предсердий, вокруг главных бронхов, в жировой ткани. Стволики и пучки имеют смешанный состав нервных волокон парасимпатической и симпатической природы.

ИГХ-анализ показал, что в ранние сроки постнатального развития формируется и основное терминальное нервное сплетение, состоящее из ремаковских волокон, тончайших варикозных аксонов парасимпатической и симпатической природы. По нашему мнению, по морфологическим признакам эта полифункциональная сеть варикозных аксонов, представляющая собой дистантные синапсы типа *en passant*, может выполнять функции «рефлексогенных зон», которые регистрируются электрофизиологическими и клиническими методами [18, 19]. Терминальное нервное сплетение хорошо выражено в проводящем миокарде венозного синуса, в ауэрбаховом ганглиозном сплетении и мышечной оболочке пищевода, в перибронхиальной и жировой ткани, вокруг мелких микрососудов — преимущественно артериол. Отдельные иммунореактивные парасимпатические и симпатические аксоны терминальной сети отмечены в эти сроки также в миокарде ушек предсердий, в незначительной степени — в основании клапанного аппарата и в верхней части межпредсердной перегородки.

В миокарде желудочков сердца и респираторных отделах легких в ранний период (1-е—7-е сут после рождения) постнатального развития перечисленные нервные структуры, как правило, редко встречаются или отсутствуют. Иннервация этих отделов сердца крысы наблюдается на поздних сроках. На 10-е сут после рождения с помощью ИГХ-реакции на ТН была обнаружена повышенная концентрация пучков симпатических нервных волокон на границе предсердий, в основании стволов аорты и легочных артерий, и в перибронхиальной зоне. Впервые показано, что в некоторых симпатических пучках средостения встречаются многочисленные парасимпатические нейроны, иммунонегативные к ТГ. В этот срок формируется эпикардальное нервное сплетение. Усиливается иннервация бурой и смешанной жировой ткани в различных участках средостения.

Одним из наиболее важных наблюдений настоящей работы служит факт раннего обнаружения, начиная с 1-х сут после рождения, на тотальных срезах через средостение в области венозного синуса, в общем миокарде для стенки верхней краниальной вены и правого предсердия, структуры, называемой «синусный узел». Термин «синусный узел» впервые предложил Бернард Лаун в 60-е гг. прошлого века [20]. В литературе накопилось много работ, посвященных этой важной анатомической структуре, состоя-

щей из специализированной ткани миокарда и обеспечивающей ритмическую бесперебойную работу сердца [21, 22]. Во многих анатомических атласах животных и человека достаточно подробно описана топография синусного узла и в целом проводящей системы сердца. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными и дополняют их. Нами подтверждена локализация синусного узла в правом предсердии новорожденных крысы, описана морфология специализированных клеток, пучковое строение проводящего миокарда. С помощью нейроиммуногистохимических маркеров обнаружена его интенсивная иннервация. Она осуществляется преимущественно терминальными варикозными аксонами постганглионарных парасимпатических нервных волокон и в меньшей степени — симпатических. Источником постганглионарных нервных волокон, по нашим данным, служат ветви вагосимпатикуса и рядом расположенный атриальный парасимпатический ганглий.

В настоящей работе обнаружено, что синусный узел в сердце новорожденных крыс достаточно хорошо иннервирован, в то время как миокард желудочков практически не содержит нервных структур. Это связано с тем, что в области венозного синуса в этот период развития уже имеются проводящие кардиомиоциты. В филогенезе проводящая ткань кровеносной системы иннервируется раньше других тканей и выполняет пейсмерные функции. Так, уже у низших хордовых животных (у ланцетника) клетки венозного синуса хорошо иннервированы. Полученный нами факт подтверждает то, что филогенетические процессы находят свое отражение в онтогенезе.

Заключение

В работе изучены нервные структуры средостения крыс в ранние сроки постнатального развития: с 1-х по 14-е сут после рождения. С помощью применения нейроиммуногистохимических маркеров — белка PGP 9.5, ТГ, синаптофизина — удалось обнаружить гетерохронность развития нейромышечных взаимоотношений, отражающих наличие рефлексогенных зон в средостении на ранних стадиях онтогенеза: на P1 обнаружены фрагменты основного терминального сплетения варикозных аксонов в проводящем миокарде правого предсердия, в синусовом узле и пучке Гиса; на более поздних сроках развития — в области гладкомышечных клеток пищевода и трахеи. Сравнительный анализ нервных структур, экспрессирующих белок PGP 9.5 и ТГ, показал, что преобладающими в исследованных отделах средостения в период 1-е—14-е сут после рождения являются холинергические структуры. На 10-е и 14-е сут постнатального развития наблюдается интенсивный рост пучков нервных волокон от общего широкопетлистого ганглиозного сплете-

ния нижнего отдела средостения вдоль поверхности сердца (по всему периметру органа), сопровождающийся в первую очередь формированием субэпикардального, а затем миокардального и субэндокардального нервного сплетений.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального государственного бюджет-

ного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», № 075-03-2024-598. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. *Периферическая нервная система*. СПб.: Наука; 1999. 280 с.
2. Привес М.Г., Лысенков Н.К., Бушкович В.И. *Анатомия человека*. 12-е изд., перераб. и доп. СПб.: Издательский дом СПбМАПО; 2006. 720 с.
3. Fregoso S.P., Hoover D.B. Development of cardiac parasympathetic neurons, glial cells, and regional cholinergic innervation of the mouse heart. *Neuroscience*. 2012;221(1):28–36.
4. Horackova M., Slavikova J., Byczko Z. Postnatal development of the rat intrinsic cardiac nervous system: a confocal laser scanning microscopy study in whole-mount atria. *Tissue Cell*. 2000;32(5):377–388.
5. Masliukov P.M., Moiseev K., Emanuilov A.I., Anikina T.A., Zverev A.A., Nozdrachev A.D. Development of neuropeptide Y-mediated heart innervation in rats. *Neuropeptides*. 2016;55(1):47–54.
6. Дуданов И.П., Пигаревский П.В., Коржевский Д.Э., Мальцева С.В., Чумасов Е.И. Атеросклероз, сахарный диабет и автономная иннервация органов сердечно-сосудистой системы. *Медицинский академический журнал*. 2012;12(2):19–27.
7. Нагорнев В.А., Чумасов Е.И., Коржевский Д.Э., Дуданов И.П., Петрова Е.С., Пигаревский П.В. Современные подходы к изучению нервных аппаратов артерий при атеросклерозе и сахарном диабете. *Медицинский академический журнал*. 2010;10(3):19–27.
8. Швалев В.Н., Реутов В.П., Рогоза А.Н., Сергиенко В.Б., Аншелес А.А., Ковалев В.П. Развитие современных представлений о нейрогенной природе кардиологических заболеваний. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014;1(55):10–14.
9. Chumasov E.I., Korzhevskii D.E., Petrova E.S., Yakovleva O.G., Pigarevsky P.V. Pathological changes in the nervous structures of the aortic wall tissue adjacent to an unstable atherosclerotic plaque. *Arkh. Patol.* 2023;85(3):12–18.
10. Dyban A.P., Puchkov V.F., Samoshkina N.A., Khozhai L.I., Chebotar N.A., Baranov V.S. Laboratory Mammals: Mouse (*Mus musculus*), Rat (*Rattus norvegicus*), Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and Golden Hamster (*Crictus auratus*). *Animal Species for Developmental Studies*. Eds.: T.A. Dettlaff and S.G. Vassetzky. Boston: Springer; 1991:351–443.
11. Grigorev I.P., Korzhevskii D.E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Modern Technologies in Medicine*. 2018;10(2):156–165.
12. Akutsu Y., Kaneko K., Kodama Y., Li H.L., Asano T., Suyama J., Tanno K., Namiki A., Shinozuka A., Gokan T., Kobayashi Y. Usefulness of severe cardiac sympathetic dysfunction to predict the occurrence of rapid atrial fibrillation in patients with Wolff-Parkinson-White syndrome. *Am. J. Cardiol.* 2013;112(5):688–693.
13. Mondal P., Nag D., Samaddar A., Mangal S., Das N, Saha I. Clinicopathological spectrum of anterior mediastinal lesions with special reference to the role of cytology in diagnosis: A cross-sectional study. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.* 2022;12(6):880–885.
14. Nasit J.G., Patel M., Parikh B., Shah M., Davara K. Anterior mediastinal masses: A study of 50 cases by fine needle aspiration cytology and core needle biopsy as a diagnostic procedure. *South Asian J. Cancer*. 2013;2(1):7–13. doi: 10.4103/2278-330X.105872.
15. Sundaram S., Vidhyalakshmi S. Histomorphological spectrum of mediastinal masses with special emphasis on Rare Lesions. *J. Clin. Diagn. Res.* 2020;14(8):1–5.
16. Suster S., Moran C.A., Dominguez-Malagon H., Quevedo-Blanco P. Germ cell tumors of the mediastinum and testis: a comparative immunohistochemical study of 120 cases. *Hum. Pathol.* 1998;29(7):737–742.
17. Vemuluri M., Philipose T.R. Histopathological study and immunohistochemistry of mediastinal masses of anterior compartment. *Annals Pathol. Lab. Med.* 2023;10(1):A1–A12.
18. Floras J.S. Arterial baroreceptor and cardiopulmonary reflex control of sympathetic outflow in human heart failure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001;940(1):500–513.
19. Krieger E.M., Da Silva G.J., Negrao C.E. Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001;940(1):338–347.
20. Lown B. Electrical reversion of cardiac arrhythmias. *Br. Heart J.* 1967;29(4):469–489.
21. Anderson R.H. Re: characterization of the ventricular conduction system in the developing mouse heart. *Cardiovasc. Res.* 2001;50(3):610–612.
22. Rentschler S., Vaidya D.M., Tamaddon H., Degenhardt K., Sassoon D., Morley G.E., Jalife J., Fishman G.I. Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development*. 2001;128(10):1785–1792.

Поступила в редакцию 17.03.2024

После доработки 23.07.2024

Принята в печать 12.09.2024

RESEARCH ARTICLE

Morphological features of rat mediastinum organs innervation at different stages of postnatal ontogenesis

E.I. Chumasov^{1, 2, *} , E.S. Petrova¹ , D.E. Korzhevskii¹ 

¹*Department of General and Special Morphology, Institute of Experimental Medicine, st. Akademika Pavlova, 12, St. Petersburg, 197022, Russia;*

²*Department of Biology, Ecology, Histology, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, st. Chernigovskaya, 5, St. Petersburg, 196084, Russia*

**e-mail: ua1ct@mail.ru*

The relevance of studying the nervous apparatus of the mediastinal organs during the period of early postnatal ontogenesis is due to the peculiarities of the birth period, when the process of blood circulation switches from placental to pulmonary, and the period of the first days of development, when the establishment of the regulation of respiration and the functioning of the cardiovascular system is observed. The purpose of this study was to comparatively study the innervation of the organs of the rat mediastinum and to elucidate interorgan and neurotissue relationships in the early postnatal period of ontogenesis. Frontal sections through the cardiopulmonary complex of rats at the age of 1, 7, 10 and 14 days were the objects of study. The nervous structures of the mediastinum were studied using neuronal markers: PGP 9.5 protein, tyrosine hydroxylase, synaptophysin. A study of the nervous apparatus of the mediastinal organs (heart, bronchi, esophagus, aorta, pulmonary artery, adipose tissue, etc.) showed that in the early stages of development, most nervous structures are cholinergic. Using an immunohistochemical reaction to synaptophysin, heterochronic development of the main terminal synaptic network en passant was revealed. A high concentration of synaptic structures in the venous sinus and in the His bundle of the rat myocardium at the age 1 and 7 days with a predominance of parasimatic innervation has been described. At the age 10 and 14 days, widespread superficial active growth of nerve fibers was noted along the entire perimeter of the organ up to its apex. The beginning of the formation of its main nerve plexuses of the heart was noted: subepicardial, myocardial and endocardium.

Keywords: *organs of the rat mediastinum, innervation, bronchi, esophagus, myocard, immunohistochemistry*

Funding: This work was state budget funded and implemented within the governmental assignment to the Institute of Experimental Medicine, Document No 075-03-2024-598.

Сведения об авторах

Чумасов Евгений Иванович — докт. биол. наук, проф. кафедры биологии, экологии, гистологии СПбГУВМ, ст. науч. сотр. отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Тел.: 8-812-234-24-38; e-mail: ua1ct@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4859-6766>

Петрова Елена Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Тел.: 8-812-234-24-38; e-mail: iemmorphol@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0972-8658>

Коржевский Дмитрий Эдуардович — проф. РАН, докт. мед. наук, зав. отделом общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Тел. 8-812-234-24-38; e-mail: iemmorphol@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2456-8165>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 581.6:[577.115+633.529.3]

Новые штаммы рода *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): состав жирных кислот и их возможное использование в качестве биодобавок для животных и человека

Е.С. Кривина¹ , М.А. Синетова² , В.В. Редькина¹ , А.В. Соромотин³ ,
Н.В. Жеребятнева³ , А.Д. Темралеева¹

¹Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина, Российская академия наук, Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук», Россия, 142290, г. Пущино, проспект Науки, д. 5;

²Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Российская академия наук, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35, стр. 2;

³Тюменский государственный университет, Россия, 625003, г. Тюмень, ул. Володарского, д. 6
*e-mail: pepelisa@yandex.ru

В последние годы в условиях нарастающего дефицита ресурсов отмечается устойчивая тенденция к поиску новых биотехнологически ценных штаммов водорослей. В данной работе представлены результаты исследования таксономического положения и ростовых характеристик, а также анализа профиля жирных кислот двух штаммов, VKM AI-463 и VKM AI-480, эустигматофитовых микроводорослей рода *Vischeria*, изолированных из Надымского района Ямало-Ненецкого автономного округа (Россия), с целью выяснения их биотехнологического потенциала. По результатам морфологического и филогенетического анализа с использованием внутреннего транскрибируемого спейсера ITS2 (internal transcribed spacer 2) штаммы были идентифицированы как *Vischeria* sp. В работе были подробно изучены скорости роста исследуемых штаммов, проведена оценка продуктивности, определено содержание суммарных липидов и исследован жирнокислотный состав. Показано, что оба штамма являются активными продуцентами пальмитиновой, эйкозапентаеновой и пальмитолеиновой кислот. Примечательно, что по содержанию пальмитолеиновой кислоты оба исследуемых штамма превосходят ее традиционные источники. У штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 конечная концентрация пальмитиновой кислоты составила $419,6 \pm 18,1$ мг/л и $501,3 \pm 57,0$ мг/л, пальмитолеиновой кислоты — $896,5 \pm 22,5$ мг/л и $1312,5 \pm 109,0$ мг/л, эйкозапентаеновой кислоты — $109,0 \pm 7,5$ мг/л и $113,7 \pm 8,8$ мг/л соответственно. В ходе сравнительного анализа установлено, что хотя оба штамма обладают несомненной биотехнологической ценностью, но именно штамм VKM AI-480 наиболее эффективно накапливает биомассу, обогащенную данными кислотами. Это делает его привлекательным в качестве альтернативного источника сырья для производства пищевых и кормовых добавок, косметических средств и биодизельного топлива.

Ключевые слова: микроводоросли, ITS2, биопроспектинг, биотехнологический потенциал, эйкозапентаеновая кислота, пальмитолеиновая кислота

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-3

Введение

В последние годы отмечается устойчивый рост интереса к поиску новых биотехнологических разработок и природоподобных технологий, а также их внедрению на промышленных предприятиях с целью обеспечения перехода к экологически чистому производству и преодолению неизбежного и усугубляющегося дефицита природных ресурсов. Биотехнологическая ценность микроводорослей обусловлена широким спектром

синтезируемых ими ценных соединений (пигментов, белков, фенолов, жирных кислот, витаминов и др.), быстротой роста, способностью увеличивать синтез целевых метаболитов при изменении условий культивирования. Использование этих фотосинтезирующих микроорганизмов как альтернативы традиционным источникам растительного сырья может способствовать наращиванию объемов производства кормовых добавок, нутрицевтиков, фармацевтических препаратов и других

биопродуктов без увеличения посевных площадей и позволит осуществлять подобную деятельность в регионах, климатические условия в которых неблагоприятны для ведения традиционного сельского хозяйства [1, 2]. Однако важным фактором, сдерживающим промышленное производство различной продукции из биомассы микроводорослей, является более высокая себестоимость производства по сравнению с традиционным растительным сырьем. Одним из способов решения данной проблемы является поиск новых штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом, которые характеризуются увеличенным содержанием целевых метаболитов и более быстрыми темпами накопления биомассы [2, 3].

Способность микроводорослей продуцировать и запасать жирные кислоты (ЖК) может быть весьма востребована для удовлетворения растущего спроса на продукты питания, кормовые и пищевые добавки, сырье для производства биотоплива третьего поколения и т.д. Во многом биотехнологический потенциал таких штаммов определяется составом ЖК, поскольку их свойства различаются. Представители рода *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta) все чаще становятся объектом биотехнологических исследований, поскольку некоторые из них способны продуцировать значительное количество эйкозапентаеновой (ЭПК) и пальмитолеиновой (ПОК) кислот [3–5]. ЭПК входит в состав липидов большинства тканей людей и животных и, хотя эта ЖК может синтезироваться из линолевой и линоленовых ЖК, скорость этого превращения очень низкая, поэтому ЭПК должна поступать в организм вместе с пищей [6]. Традиционным источником ЭПК являются рыбий и крилевый жир, а также морепродукты. ЭПК снижает синтез триглицеридов и холестерина в организме животных и человека, уменьшает риск возникновения тромбов, оказывает противовоспалительное действие и дает положительный эффект при лечении воспалительных заболеваний кишечника, артритов, сердечно-сосудистых заболеваний и некоторых типов рака [6, 7]. Также дополнительное введение ЭПК в рацион животных оказывает влияние на состав жирных кислот молока и молочного жира, способствует увеличению доли ЖК, полезных для здоровья молодняка и человека. В последнее время значительное внимание в исследованиях уделяется кормовым добавкам, полученным из микроводорослей, для различных видов жвачных животных [8]. Было показано, что у коров присутствующая в значительном количестве во всех микроводорослях пальмитиновая кислота (ПК) повышает усвояемость корма, удой, концентрацию и выход молочного жира, а также эффективность производства молока по сравнению с контрольным рационом [9]. ЭПК вместе с линолевой кислотой может повысить эффективность репродук-

тивного управления и фертильности у молочных коров [10]. Что касается эустигматофитовых водорослей, то уже успешно использовалось добавление *Nannochloropsis oculata* в рацион нубийских коз, что улучшило молочную продуктивность и питательную ценность молока [11]. Учитывая тенденции к росту спроса на полиненасыщенные ЖК (ПНЖК) и ограниченность рыбных запасов в природных экосистемах, встает вопрос о создании стабильного промышленного метода производства продуктов с высоким содержанием омега-3 и омега-6 ПНЖК в целом и ЭПК в частности [1, 2].

ПОК, обладающая рядом уникальных свойств полезных для здоровья животных и человека, в последние годы привлекает значительное внимание исследователей. ПОК может действовать в организме животных и человека подобно гормону. При нормальном поступлении в ткани способствует снижению уровня белка, что вызывает уменьшение интенсивности воспалительных проявлений и помогает внутренним системам противостоять болезням более эффективно. Многочисленные исследования показали, что ПОК уменьшает содержание свободного холестерина, повышает чувствительность к инсулину в печени и скелетных мышцах, увеличивает текучесть клеточных мембран, подавляет онкогенез, снижает воспаление, связанное с диабетом, болезнями сердца и другими проблемами со здоровьем [12, 13]. В силу этого ПОК имеет большое значение для производства функциональных продуктов питания, косметики, товаров для здоровья и фармацевтических препаратов, а также кормовых добавок в животноводстве. В небольших количествах ПОК содержится в различных растительных маслах, животных жирах и в «морском масле» [14, 15]. Значительное количество ПОК содержит масло облепихи [16] и орехов макадамии [17], однако эти растения имеют низкую урожайность и их трудно выращивать в больших масштабах, что делает полученное из них масло очень дорогим. Учитывая ее разнообразное применение и предполагаемый спрос на рынке, поиск надежного и эффективного альтернативного продуцента ПОК приобретает особое значение.

В то же время ряд исследователей утверждает, что польза от применения полиненасыщенных жирных кислот сильно преувеличена. Так, в одном из обзоров [18] отмечается, что употребление омега-3-ПНЖК не влияет на риск сердечно-сосудистых заболеваний и смертность, а исследования влияния ПНЖК ставят под сомнение их позитивное влияние на сохранение и восстановление когнитивных функций пожилых пациентов [19, 20]. Кроме того, чрезмерное увеличение доли некоторых ПНЖК в рационе также может оказывать негативное влияние на здоровье человека и животных. Например, чрезмерное потребление омега-6-ПНЖК способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний, психиатрических откло-

нений, иммунодефицита и может стимулировать развитие раковых опухолей [21, 22]. Поэтому при разработке новых препаратов крайне важно соблюдать все этапы тестирования, перед употреблением нельзя пренебрегать консультацией специалистов и крайне важно соблюдать рекомендованные дозировки.

Данная статья посвящена определению таксономического положения, изучению ростовых характеристик и анализу профиля ЖК двух штаммов эустигматофитовых микроводорослей рода *Vischeria* (Heterokontophyta), изолированных из Надымского района Ямало-Ненецкого автономного округа (Россия), с целью выяснения их биотехнологического потенциала.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами исследования стали два штамма микроводорослей, VKM AI-463 (=11L-4) и VKM AI-480 (=5-5), которые были выделены из накопительных культур с поверхности таллома лишайника и из почвенной пробы, отобранных в Надымском районе Ямало-Ненецкого автономного округа соответственно.

Характеристика района исследования и отбор образцов. Район исследования расположен в пределах северной тайги Западной Сибири с преобладанием хвойных видов древесных растений и расположен на второй надпойменной террасе в нижнем течении реки Надым. Территория представляет собой эоловый песчаный ландшафт площадью около 3 км² (N65,356081° E72,965710°). Полевые работы, включавшие отбор проб почвы и талломов лишайников, были проведены в августе 2022 г. в пределах молодого леса. Пробы почвы (Albic Podzols) отбирали с поверхности в объеме 5×5×5 см, талломы лишайника отбирали целиком. Все образцы помещали в стерильные пластиковые контейнеры для дальнейшей транспортировки в лабораторию.

Изоляция и культивирование штаммов микроводорослей. Штамм VKM AI-463 был изолирован из накопительной культуры, для получения которой отделяли часть лишайника из 5 точек исходного образца с помощью стерильного пинцета и помещали в питательную среду 3N BBM в стерильном стеклянном бюксе. Накопительная культура, из которой был выделен штамм VKM AI-480, была получена путем добавления 5 г изучаемой почвы к 20 мл среды 3N BBM+Vit в стерильный стеклянный бюкс. Затем содержимое было тщательно перемешано. Бюксы были помещены в осветительную установку. На 7-е сут из каждого бюкса отобрали по 30 мкл накопительной культуры и перенесли на чашку Петри со средой 3N BBM+Vit. Суспензия была распределена по поверхности агара стерильным шпателем Дригальского. Монокультуры были получены путем посева штрихом с последующей изоляцией

отдельных колоний с помощью пипетки. Полученные штаммы культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура +23–25°C, свет 60–75 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹, фотопериод 12 ч). Все изученные штаммы были депонированы во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Световая микроскопия, выделение тотальной ДНК, амплификация, очистка и секвенирование ампликонов проводились по ранее описанным протоколам [23]. Условия и праймеры для амплификации популярного ДНК-баркода – ITS2 – использовались из работы [24].

Молекулярно-филогенетический анализ проводили по стандартным алгоритмам, описанным ранее [23]. Для сравнения топологий деревьев использовали данные соответствующих статей [5, 25, 26].

Условия культивирования для характеристики биотехнологического потенциала. Перед началом эксперимента штаммы подращивали 14 сут в колбах со 100 мл среды 3N BBM при температуре 27°C (по данным предварительного тестирования эта температура является оптимальной) и постоянном освещении с интенсивностью 30 мкмоль м⁻² с⁻¹. Интенсивное культивирование проводили в лабораторной установке, в сосудах с 250 мл 3N BBM при температуре 27±1°C и двустороннем освещении с интенсивностью 150 мкмоль м⁻² с⁻¹ с каждой стороны. Аэрацию проводили стерильным воздухом с 1,5–2% CO₂. Для адаптации каждый штамм предварительно выращивали до экспоненциальной фазы в указанных условиях, затем разбавляли свежей средой до ОП₇₅₀=0,02 и распределяли по трем сосудам, в которых проводился эксперимент. Пробы для определения сухой массы, содержания суммарных липидов (СЛ) и определения ЖК СЛ отбирали в конце экспоненциальной фазы (на 3-и сут) и при переходе к стационарной фазе (на 10-е сут).

Измерение скорости роста и оценка продуктивности. Рост культуры ежедневно оценивали по изменению оптической плотности культуры, измеренной при 750 нм и по приросту биомассы, как описано ранее [4].

Определение содержания СК и жирнокислотного состава. Для определения жирнокислотного состава суммарных липидов предварительно зафиксированную биомассу омыляли 1М КОН в 80%-ном этаноле, отмывали неомыляемые компоненты от свободных ЖК н-гексаном. Свободные ЖК получали добавлением 20%-ной серной кислоты, экстрагировали н-гексаном и метилировали. Метилловые эфиры ЖК анализировали на приборе

Хроматэк Кристалл 5000.2 NP с квадрупольным МС детектором и колонкой Restek Rtx-2330 (60 м, кат. № 10726, Роклин, США). СЛ оценивали по количеству этерифицированных ЖК на 1 г сухой массы клеток. Внутренний стандарт — добавленная маргаиновая кислота.

Статистическая обработка данных. Оценка топологии для деревьев ML основывалась на 1 тыс. реплик теста SH-aLRT. Эффективность результатов, полученных методом Байеса, была оценена с помощью программы Tracer версии 1.7. Более подробно методы оценки изложены в работе [23]. Средние значения результатов измерений

содержания ЖК в трех биологических повторностях и стандартные отклонения рассчитаны с использованием программы Excel (Microsoft Office ver. 2010).

Результаты и обсуждение

Морфология штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 была схожа (рис. 1А–Г). Клетки одиночные, преимущественно шаровидные, однако у штамма VKM AI-463 иногда в культуре встречались широкоовальные клетки. В среднем размер вегетативных клеток у исследуемых штаммов был близок: штамм VKM AI-463 — 5,7–10 мкм в диаметре, штамм VKM

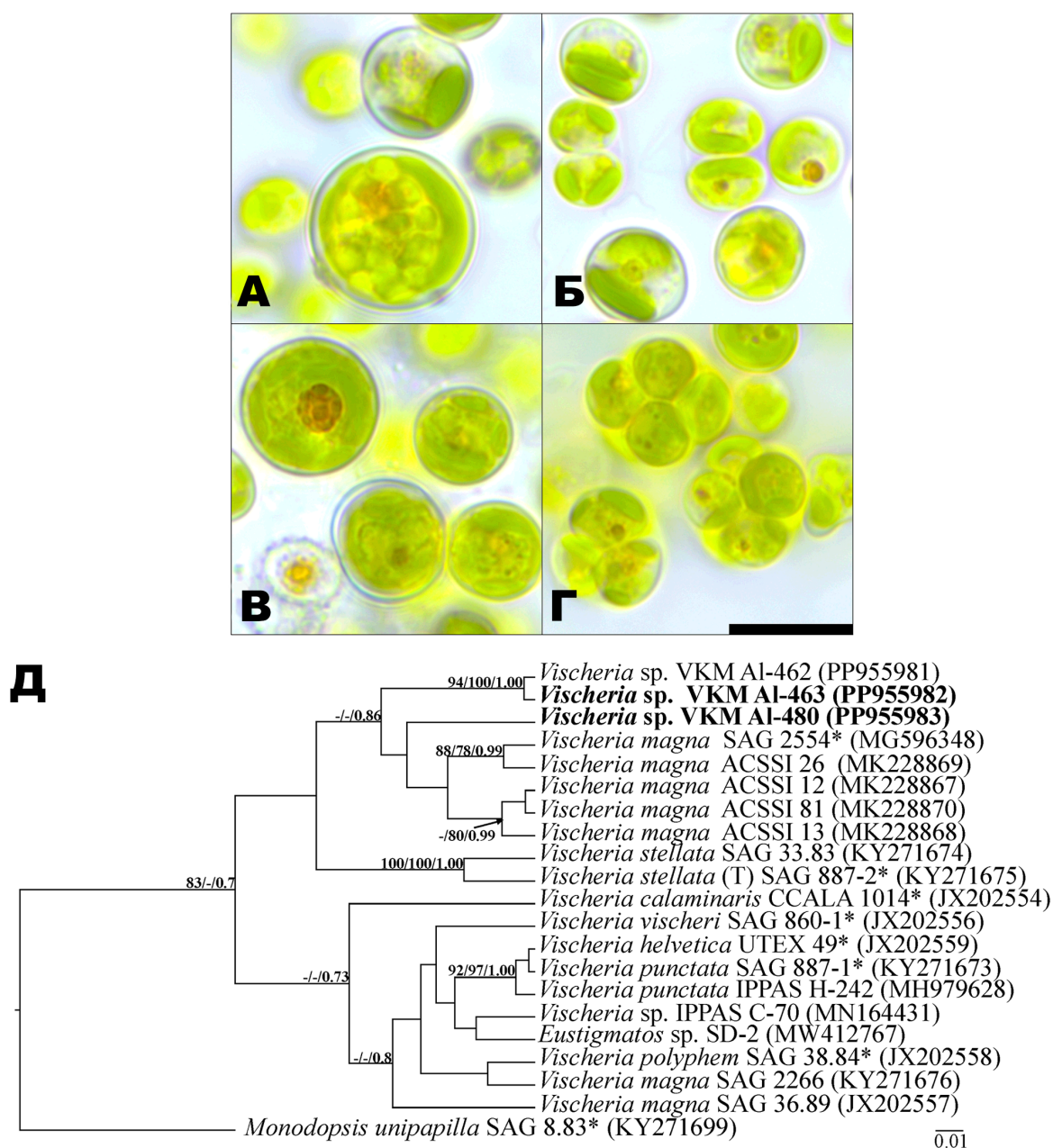


Рис. 1. Штамм *Vischeria* sp. VKM AI-463: А — зрелые вегетативные клетки, Б — автоспорангии; *Vischeria* sp. VKM AI-480: В — зрелые вегетативные клетки, Г — автоспорангии. Шкала 10 мкм. Д — укорененное Байесовское филогенетическое дерево эустигматофитовых микроводорослей рода *Vischeria*, построенное на основе последовательностей ITS2 (длина выравнивания — 310 н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT/BP/PP. Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0,7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2e+G4. Обозначения: * — аутентичный штамм; (T) — типовой вид.

AI-480 – 6,8–12,1 мкм. При этом в культуре VKM AI-463 единично встречались клетки до 17 мкм в диаметре. Клеточная оболочка гладкая. Хлоропласт пристенный, чашевидный или корытовидный, со временем лопающийся, с одним полиэдрическим пиреноидом и красной глобулой. В клетках часто имеется от одной до нескольких вакуолей, окруженных гранулами. Размножение осуществлялось с помощью автоспор: 2–4 у VKM AI-463 и до 8 у VKM AI-480. Оболочки автоспорангиев также довольно прочные и могут сохраняться некоторое время в культуре. Половой процесс и зооспоры не наблюдали. По итогам морфологического анализа оба исследуемых штамма были идентифицированы как *Vischeria* sp.

Филогенетический анализ с использованием ITS2 подтвердил, что исследуемые штаммы VKM AI-463 и VKM AI-480 принадлежат к роду *Vischeria* (рис. 1Д). Штаммы VKM AI-463 и VKM AI-462 объединились в хорошо поддерживаемую группу, а VKM AI-480 представлял отдельную филогенетическую линию. Перечисленные штаммы являлись сестринскими к кластеру *V. magna*. Однако кластеризация внутри рода характеризовалась преимущественно низкими статистическими поддержками, и в целом использование ITS2 не позволило разрешить топологию рода *Vischeria* и однозначно установить таксономический статус исследуемых штаммов. В свою очередь, морфологические характеристики штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 близки к таковым у представителей *V. magna*. Однако анализ генетических дистанций ставит принадлежность исследуемых штаммов к *V. magna* под сомнение. Так, генетические различия между штаммом VKM AI-463 и аутентичным штаммом *V. magna* SAG 2554 – 2,6%, между штаммами VKM AI-480 и VKM AI-463 – 4,8%, между VKM AI-480 и *V. magna* SAG 2554 – 3,9%. На примере штаммов *V. stellata*, кластеризующихся с аутентичным штаммом *V. stellata* SAG 887-2, и штаммов *V. magna*, группирующихся с аутентичным штаммом *V. magna* SAG 2554, можно предположить, что вну-

тривидовые генетические дистанции составляют 0–2,1%. При этом межвидовые дистанции варьируют от 0% (*V. helvetica* и *V. punctata*) до 9,6% (*V. stellata* и *V. vischeri*). Таким образом, уровень генетических различий между VKM AI-463, VKM AI-480 и аутентичным штаммом *V. magna* нельзя однозначно интерпретировать как внутри- или межвидовой. В целом данный вопрос нуждается в дополнительном исследовании, т.к. в статье Кривенда с соавт. [26] была показана внутривидовая вариабельность ITS2. Анализ вторичных структур ITS2 не внес дополнительной ясности, поскольку компенсаторные замены между исследуемыми штаммами и аутентичным штаммом *V. magna* отсутствовали. Проблема неинформативности традиционных филогенетических маркеров – гена 18S рРНК и ITS2 для видовой идентификации внутри рода *Vischeria* отмечалась также в ряде исследований [25, 26]. Поэтому для установления точного видового статуса в дальнейшем планируется провести дополнительное исследование пластидного гена *rbcL*. На данном этапе штаммы VKM AI-463 и VKM AI-480 идентифицированы как *Vischeria* sp.

Рост штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 описывался классической сигмоидной кривой (рис. 2). Лаг-фаза ни у одного из штаммов не наблюдалась (скорость роста была максимальной уже в 1-е сут), т.к. они были предварительно адаптированы к условиям интенсивного культивирования. Максимальная удельная скорость роста ($\mu_{\max}$) штамма VKM AI-480 равнялась $1,258 \pm 0,09$ /сут, что соответствует $T_{\text{удв}}$ $13,3 \pm 1,0$ ч. У штамма VKM AI-463 $\mu_{\max}$ составляла $1,00 \pm 0,06$ /сут, что соответствует $T_{\text{удв}}$ $16,7 \pm 1,0$ ч. Продуктивность в линейной фазе роста у штаммов VKM AI-480 и VKM AI-463 была 1,1 г/л·сут и 0,74 г/л·сут соответственно. Конечная концентрация биомассы на 10-е сут культивирования у штаммов VKM AI-480 и VKM AI-463 достигла $8,1 \pm 0,8$ г/л и $5,4 \pm 0,2$ г/л соответственно. По накоплению биомассы штамм VKM AI-480 ($8,1 \pm 0,8$ г/л на 10-е сут) сходен с другими уже исследованными

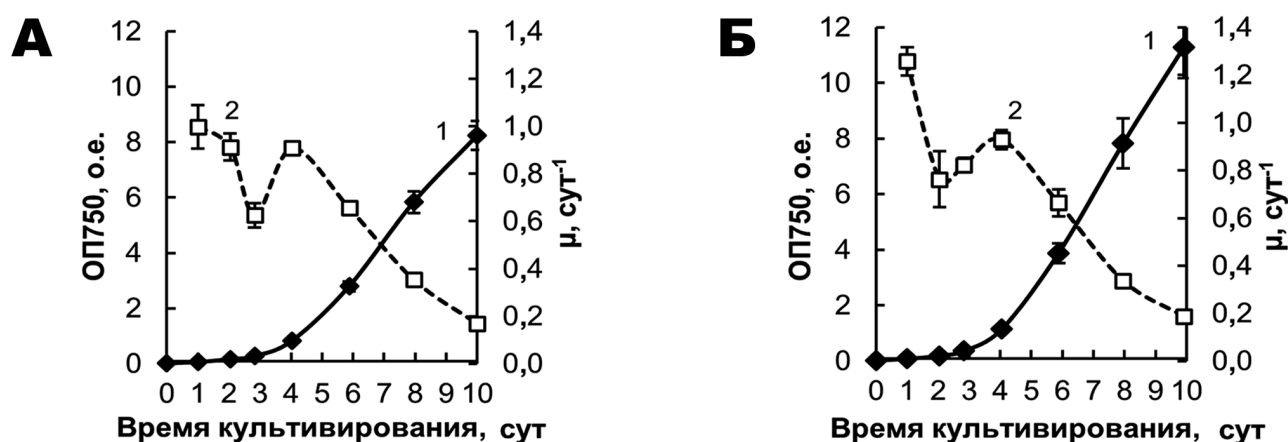


Рис. 2. Кривые роста и удельные скорости роста исследованных штаммов VKM AI-463 (А) и VKM AI-480 (Б). 1 – кривая роста, 2 – удельная скорость роста, μ .

штаммами рода *Vischeria*, выращенными при том же содержании азота в течение аналогичного периода времени (6–8,27 г/л) [4, 5, 27–29].

Профили ЖК исследуемых штаммов представлены в таблице. Основными ЖК у обоих исследуемых штаммов были ПК, ПОК, олеиновая и линолевая кислоты, а также ЭПК. Содержание ЖК СЛ у штамма VKM AI-463 в экспоненциальной фазе составляло $25,1 \pm 1,4\%$ от сухого веса, в стационарной фазе – $31,8 \pm 2,4\%$. У штамма VKM AI-480 содержание ЖК СЛ было несколько ниже как в экспоненциальной ($15,4 \pm 1,9\%$), так и в стационарной ($30,4 \pm 1,2\%$) фазах. По содержанию липидов при переходе в стационарную фазу (30,4% и 31,8% от сухой массы) изучаемые штаммы также сходны с другими представителями рода *Vischeria*, имеющими биотехнологический потенциал и выращенными при том же содержании азота (СЛ 34,1–42%) [27, 29].

Оба штамма являются активными продуцентами ПК, ПОК и ЭПК. При переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста доля ПОК в составе ЖК у обоих штаммов возрастала от 41,1% до 52,5–53,3%, а доли ПК и ЭПК, наоборот, снижались от 29,1–32,8% до 20,3–24,6% и от 10,8–12,1% до 4,6–6,4% соответственно. У штамма VKM AI-480 в стационарной фазе так-

же увеличивалось относительное содержание олеиновой кислоты от 5,5 до 14,2%. Однако в пересчете на сухую массу содержание ПК и ЭПК оставалось постоянным у обоих штаммов, а содержание ПОК возрастало. Максимальная концентрация этих ЖК в расчете на 1 л суспензии была достигнута в конце культивирования. У штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 конечная концентрация ПК составила $419,6 \pm 18,1$ мг/л и $501,3 \pm 57,0$ мг/л соответственно, а конечная концентрация ПОК – $896,5 \pm 22,5$ мг/л и $1312,5 \pm 109,0$ мг/л соответственно. По содержанию ПОК в суммарных ЖК и по концентрации ПОК в культуре штамм VKM AI-480 сравним с наиболее продуктивными штаммами, выращенными при том же содержании азота: >45–54,1% и 1326–1671 мг/л [28, 30, 31]. Оба изученных штамма превосходили по содержанию ПОК в биомассе такие традиционные источники ПОК, как ягоды облепихи (в среднем 4,3% от сухой массы ягод) и норковый жир (15%) [15, 16], и были сравнимы с орехами макадами (10,4%–24,8% от сухой массы) [32]. Конечная концентрация ЭПК у штаммов VKM AI-463 и VKM AI-480 составила $109,0 \pm 7,5$ мг/л и $113,7 \pm 8,8$ мг/л соответственно. В то же время по максимальному содержанию ЭПК в суммарных ЖК в экспоненциальной фазе

Таблица

Содержание ЖК в штаммах VKM AI-463 и VKM AI-480

ЖК (% от суммы ЖК)	Штамм VKM AI-463		Штамм VKM AI-480	
	экспоненциальная фаза	стационарная фаза	экспоненциальная фаза	стационарная фаза
14:0	$2,4 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,1$
16:0	$32,8 \pm 0,6$	$24,6 \pm 0,4$	$29,1 \pm 2,1$	$20,3 \pm 0,4$
16:1 ^{Δ7}	$1,8 \pm 0,2$	н/о	н/о	н/о
16:1 ^{Δ9}	$41,1 \pm 1,2$	$52,5 \pm 0,6$	$41,1 \pm 0,7$	$53,3 \pm 0,8$
16:1 ^{Δ11}	$0,4 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,1$	н/о	н/о
18:0	$1,1 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,0$
18:1 ^{Δ9}	$3,9 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,9$	$14,2 \pm 0,5$
18:1 ^{Δ11}	<0,1	$0,4 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,0$
18:2 ^{Δ9,12}	$2,3 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$
18:3 ^{Δ9,12,15}	$0,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
20:3 ^{Δ8,11,14}	$0,3 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$
20:4 ^{Δ5,8,11,14}	$1,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,0$
20:5 ^{Δ5,8,11,14,17}	$10,8 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,3$	$12,1 \pm 1,0$	$4,6 \pm 0,1$
Содержание ЖК СЛ, % от с.м.	$25,1 \pm 1,4$	$31,8 \pm 2,4$	$15,4 \pm 1,9$	$30,4 \pm 1,2$
Содержание ПК, % от с.м.	$8,2 \pm 0,4$	$7,8 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,5$	$6,2 \pm 0,3$
Концентрация ПК, мг/л	$17,7 \pm 2,3$	$419,6 \pm 18,1$	$13,7 \pm 2,1$	$501,3 \pm 57,0$
Содержание ПОК, % от с.м.	$10,3 \pm 0,3$	$16,7 \pm 1,2$	$6,3 \pm 0,2$	$16,3 \pm 0,4$
Концентрация ПОК, мг/л	$22,3 \pm 3,6$	$896,5 \pm 22,5$	$19,5 \pm 4,6$	$1312,2 \pm 109,0$
Содержание ЭПК, % от с.м.	$2,7 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,0$
Концентрация ЭПК, мг/л	$5,8 \pm 0,6$	$109,4 \pm 7,5$	$5,8 \pm 1,8$	$113,7 \pm 8,8$

Примечание: н/о – не обнаружено, с.м. – сухая масса.

изучаемые штаммы существенно уступают ряду продуцентов, у которых ее доля составляет 20,6%–43,2% [4, 27]. Однако за счет накопления биомассы и высокого содержания липидов в стационарной фазе концентрация ЭПК в культуре изучаемых штаммов в конечном итоге достигает высоких показателей [29]. Важно отметить, что выход целевых метаболитов исследуемых штаммов может быть повышен за счет оптимизации условий культивирования при подборе источника азота и его концентрации, интенсивности освещения и температуры [31].

Заключение

Современные проблемы и вызовы, такие как истощение природных ресурсов и рост численности населения, привели к появлению новой научной дисциплины, интегрирующей биологию и экономику, биоэкономики, одним из направлений которой является поиск биотехнологически перспективных штаммов микроорганизмов, имеющих коммерческое значение, или биопроспектинг (биоразведка). Микроводоросли, большинство из которых являются высокоадаптируемыми фототрофными микроорганизмами, продуцируют широкий спектр ценных соединений. Возможность управления метаболизмом штаммов за счет подбора культуральных условий и применения технологий генетической инженерии позволяют

превратить их в высокоэффективные зеленые биофабрики для производства дорогостоящих продуктов. В последнее время эустигматофитовые микроводоросли привлекают все большее внимание в связи с их высоким коммерческим потенциалом. Однако научный интерес по-прежнему сильно смещен в сторону морских родов *Nannochloropsis* и *Microchloropsis*. Хотя известно, что представители рода *Vischeria* являются эффективными продуцентами биомассы, обогащенной ПОК и ЭПК. В нашей работе было показано, что оба новых штамма VKM Al-480 и VKM Al-463, выделенные с песчаных дюн, обладают биотехнологической перспективностью. Однако именно штамм VKM Al-480 характеризуется наиболее высокой продуктивностью по биомассе и высоким содержанием ПК и ПОК, а также производит значительное количество ЭПК в стационарной фазе. Это делает его привлекательным в качестве альтернативного источника сырья для производства пищевых и кормовых добавок, косметических средств и биодизельного топлива.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №24-16-00163). Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blasio M., Balzano S. Fatty acids derivatives from eukaryotic microalgae, pathways and potential applications. *Front. Microbiol.* 2021;12:718933.
2. Maltsev Y., Maltseva K. Fatty acids of microalgae: diversity and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2021;20(2):515–547.
3. Gao B., Xia S., Lei X., Zhang C. Combined effects of different nitrogen sources and levels and light intensities on growth and fatty acid and lipid production of oleaginous eustigmatophycean microalga *Eustigmatos* cf. *polyphem*. *J. Appl. Phycol.* 2018;30(1):215–229.
4. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Starikov A.Y., Voronkov A.S., Medvedeva A.S., Krivova Z.V., Pakholkova M.S., Bachin D.V., Bedbenov V.S., Gabrielyan D.A., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Los D.A. Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strains from the IPPAS culture collection. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020;56(7):794–808.
5. Sidorov R.A., Starikov A.Y., Sinetova M.A., Guilmisarian E.V., Los D.A. Identification of conjugated dienes of fatty acids in *Vischeria* sp. IPPAS C-70 under oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(6):323.
6. Lenihan-Geels G., Bishop K., Ferguson L. Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients* 2013;5(4):1301.
7. Coniglio S., Shumskaya M., Vassiliou E. Unsaturated fatty acids and their immunomodulatory properties. *Biology.* 2023;12(2):279.
8. Jack A., Adegbeye M., Ekanem D., Faniyi T., Fajemisin A.N., Elghandour M.M., Salem A.Z.M., Rivas-Caceres R.R., Adewumi K., Edoh O. Microalgae application in feed for ruminants. *Handbook of Food and Feed from Microalgae*. Eds. E. Jacob-Lopez, M.I. Queiroz, M.M. Maroneze, and L.Q. Zepka. Academic Press; 2023:397–409.
9. De Souza J., Lock A.L. Milk production and nutrient digestibility responses to triglyceride or fatty acid supplements enriched in palmitic acid. *J. Dairy Sci.* 2019;102(5):4155–4164.
10. Staples C.R., Burke J.M., Thatcher W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 1998;81(3):856–871.
11. Kholif A.E., Gouda A.G., Hatem A.H. Performance and milk composition of nubian goats as affected by increasing level of *Nannochloropsis oculata* microalgae. *Animals.* 2020;10(12):2453.
12. Wu Y., Li R., Hildebrand D.F. Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. *Prog. Lipid Res.* 2012;51(4):340–349.
13. Kolouchová I., Sigler K., Schreiberová O., Masák J., Řezanka T. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresour.* 2015;192:726–734.
14. Okullo A.A., Temu A.K., Ogowok P., Ntalikwa J.W. Physico-chemical properties of biodiesel from jatropha and castor oils. *Int. J. Renew. Energy Res.* 2012;2(1):47–52.

15. Shinde S., Kale A., Kulaga T., Licamele J.D., Tonkovich A.L. Omega 7 rich compositions and methods of isolating omega 7 fatty acids. US20130129775 A1. 2013.
16. Yang B.R., Kallio H.P. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. *J. Agric. Food. Chem.* 2001;49(4):1939–1947.
17. Knothe G. Biodiesel derived from a model oil enriched in palmitoleic acid macadamia nut oil. *Energy Fuels.* 2010;24(3):2098–2103.
18. Abdelhamid A.S., Brown T.J., Brainard J.S., Biswas P., Thorpe G.C., Moore H.J., Deane K.H., AlAbdulghafoor F.K., Summerbell C.D., Worthington H.V., Song F., Hooper L. Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018;7(7):CD003177.
19. Forbes S.C., Holroyd-Leduc J.M., Poulin M.J., Hogan D.B. Effect of nutrients, dietary supplements and vitamins on cognition: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Can. Geriatr. J.* 2015;18(4):231–245.
20. Alex A., Abbott K.A., McEvoy M., Schofield P.W., Garg M.L. Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and cognitive decline in non-demented adults: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Rev.* 2020;78(7):563–578.
21. Lands B. A critique of paradoxes in current advice on dietary lipids. *Prog. Lipid Res.* 2008;47(2):77–106.
22. Зайцева Л.В., Нечаев А.П. Полиненасыщенные жирные кислоты в питании: современный взгляд. *Пищевая промышленность.* 2014;4:14–19.
23. Krivina E., Portnov A., Temraleeva A. A description of *Aliichlorella ignota* gen. et sp. nov. and a comparison of the efficiency of species delimitation methods in the Chlorella-clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 2024;72(3):180–190.
24. Procházková K. Diverzita a druhový koncept u komplexu *Vischeria/Eustigmatos* (Eustigmatophyceae). Praha: Karlova univerzita; 2012. 79 pp.
25. Темралева А.Д., Портная Е.А. Морфологический и молекулярно-генетический анализ рода *Vischeria* (Eustigmataceae, Ochrophyta) в альгологической коллекции АСССИ. *Бот. журн.* 2022;107(2):132–148.
26. Kryvenda A., Rybalka N., Wolf M., Friedl T. Species distinctions among closely related strains of Eustigmatophyceae (Stramenopiles) emphasizing ITS2 sequence-structure data: *Eustigmatos* and *Vischeria*. *Eur. J. Phycol.* 2018;53(4):471–491.
27. Xu J., Li T., Li C.L., Zhu S.N., Wang Z.M., Zeng E.Y. Lipid accumulation and eicosapentaenoic acid distribution in response to nitrogen limitation in microalga *Eustigmatos vischeri* JHsu-01 (Eustigmatophyceae). *Algal Res.* 2020;48:101910.
28. Wang F., Gao B., Huang L., Su M., Dai C., Zhang C. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. *Bioresour. Technol.* 2018;270:30–37.
29. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Medvedeva A.A., Starikov A.Y., Markelova A.G., Allakhverdiev S.I., Los D.A. Effect of salt stress on physiological parameters of microalgae *Vischeria punctata* strain IPPAS H-242, a superproducer of eicosapentaenoic acid. *J. Biotechnol.* 2021;331:63–73.
30. Gao B., Yang J., Lei X., Xia S., Li A., Zhang C. Characterization of cell structural change, growth, lipid accumulation, and pigment profile of a novel oleaginous microalga, *Vischeria stellata* (Eustigmatophyceae), cultured with different initial nitrate supplies. *J. Appl. Phycol.* 2016;28(2):821–830.
31. Krzemińska I., Nosalewicz A., Reszcyńska E., Pawlik-Skowrońska B. Enhanced light-induced biosynthesis of fatty acids suitable for biodiesel production by the yellow-green alga *Eustigmatos magnus*. *Energies.* 2020;13(22):6098.
32. Kaijser A., Dutta P.C., Savage G.P. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. *Food Chem.* 2020;71(1):67–70.

Поступила в редакцию 10.04.2024

После доработки 06.09.2024

Принята в печать 11.09.2024

RESEARCH ARTICLE

New strains of the genus *Vischeria* (Eustigmatophyceae, Heterokontophyta): composition of fatty acids and their possible use as dietary supplements for animals and humans

E.S. Krivina¹ , M.A. Sinetova² , V.V. Red'kina¹ , A.V. Soromotin³ ,
N.V. Zheryatyeva³ , A.D. Temraleeva¹ 

¹All-Russian Collection of Microorganisms, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Nauka Prospect 5, Pushchino, 142290, Russian Federation;

²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya st. 35, Moscow, Russian Federation;

³Tyumen State University, Volodarsky st. 6, Tyumen, 625003, Russian Federation

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

In recent years, amid an increasing shortage of resources, there has been a steady trend towards the search for new biotechnologically valuable algae strains. This paper presents the results of a study of the taxonomic position, growth characteristics and analysis of the fatty acid profile of two strains of eustigmatophyte microalgae of the genus *Vischeria* (Heterokontophyta) isolated

from the Nadymsky district of the Yamalo-Nenets Autonomous Okrug (Russia) in order to clarify their biotechnological potential. According to the results of morphological and phylogenetic analysis using internal transcribed spacer 2 (ITS2), the strains were identified as *Vischeria* sp. In the work, the growth rates of the studied strains were studied in detail, productivity was assessed, the content of total lipids was determined and the fatty acid composition was studied. It has been shown that both are active producers of palmitic, eicosapentaenoic and palmitoleic acids. It is noteworthy that in terms of the content of palmitoleic acid, both strains studied are superior to its traditional sources. In the strains VKM AI-463 and VKM AI-480, the final concentration of palmitic acid was $419,6 \pm 18,1$ mg/l and $501,3 \pm 57,0$ mg/l, palmitoleic acid – $896,5 \pm 22,5$ mg/l and $1312,5 \pm 109,0$ mg/l, eicosapentaenoic acid – $109,0 \pm 7,5$ mg/l and $113,7 \pm 8,8$ mg/l, respectively. During the comparative analysis, it was found that although both strains had undoubted biotechnological value, it was the VKM AI-480 strain that most effectively accumulated biomass enriched with these acids. This makes it attractive as an alternative source of raw materials for the production of food and feed additives, cosmetics and biodiesel.

Keywords: *microalgae, ITS2, bioprospecting, biotechnological potential, eicosapentaenoic acid, palmitoleic acid*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 24-16-00163.

Сведения об авторах

Кривина Елена Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. ИБФМ РАН. Тел.: 8-937-667-42-72; e-mail: pepelisa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0849-5832>

Синетова Мария Андреевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаборатории экофизиологии микроводорослей ИФР РАН. Тел.: 8-499-678-54-00; e-mail: maria.sinetova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9931-1762>

Редькина Вера Вячеславовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ИБФМ РАН. Тел.: 8-937-667-42-72; e-mail: kalmykova_v_v@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4908-5098>

Соромотин Андрей Владимирович — док. биол. наук, директор НИИ экологии и РИПР Тюменского государственного университета. Тел.: 8-3452-41-00-59; e-mail: asoromotin@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7771-4592>

Жеребятьева Наталья Владимировна — канд. геогр. наук, доц. кафедры физической географии и экологии Тюменского государственного университета. Тел.: 8-3452-59-74-29, e-mail: jerebiatieva@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9492-1377>

Темралеева Анна Диссенгалиевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ИБФМ РАН. Тел.: 8-4967-73-86-20; e-mail: temraleeva@pbcras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3445-0507>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.085.23+576.5

Влияние фракций клеточного лизата естественных киллеров на пролиферацию клеток трофобласта в системе *in vitro***А.В. Корневский*** , **Ю.П. Милютин** , **С.К. Бочковский** , **Д.И. Соколов** ,
С.А. Сельков , **О.Н. Беспалова** *Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта,
Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3***e-mail: a.korenevsky@yandex.ru*

Развитие плаценты во многом определяется взаимодействием естественных киллеров (НК-клетки) и клеток трофобласта. Несмотря на интенсивные исследования, роль НК-клеток и методы коррекции их функциональной активности в репродукции остаются спорными. Целью данного исследования стало изучение влияния белковых фракций лизата НК-клеток на пролиферацию клеток трофобласта в модельном эксперименте *in vitro*. В результате хроматографического разделения было получено шесть фракций клеточного лизата с различным набором входящих в их состав белков (25–250 кДа). Установлено, что все исследованные фракции стимулируют пролиферацию клеток трофобласта. Во фракциях с молекулярными массами 36–250 кДа, 29–66 кДа и 47–62 кДа обнаружены маркеры пролиферации – протеинкиназа В (АКТ/РКВ) и киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (ERK1/2). Полученные данные об изменении пролиферативной активности клеток линии JEG-3 под влиянием белковых фракций лизата клеток линии NK-92 гипотетически отражают поведение клеток хориона в окружении НК-клеток в случае их гибели при физиологических и патологических состояниях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, а также другими стрессорными факторами, приводящими к репродуктивной патологии.

Ключевые слова: *репродукция, плацента, естественные киллеры, трофобласт, пролиферация, АКТ/РКВ, ERK1/2*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-4

Введение

Межклеточная коммуникация является неотъемлемой составляющей регуляции физиологических процессов в многоклеточном организме. Обмен сигналами может производиться как в одностороннем порядке, так и в контексте «диалога». Вариативность биологического ответа зависит от способов взаимодействия, среди которых можно выделить непосредственный клеточный контакт, секрецию и высвобождение сигнальных молекул, а также коммуникацию с помощью микровезикул [1, 2].

Естественные киллеры (НК-клетки, natural killer cells, NK cells) – популяция клеток врожденного иммунитета, обладающая цитотоксическими функциями и играющая регуляторную роль в отношении взаимодействующих с ними клеток благодаря рецепторному аппарату и за счет продукции цитокинов [3]. Развитие плаценты во многом определяется взаимодействием децидуальных НК-клеток и клеток трофобласта [4]. При наступлении беременности НК-клетки аккумулируют-

ся вокруг клеток трофобласта, принимая участие в регуляции пролиферации, миграции и инвазии трофобласта за счет секреции цитокинов и ростовых факторов [5]. Трофобласт в свою очередь секретирует хемокины и экспрессирует лиганды к адгезионным рецепторам НК-клеток [6]. В условиях контактного взаимодействия НК-клетки оказывают прямое цитотоксическое действие в отношении клеток трофобласта [7]. Причем их цитотоксичность зависит от того, находятся они в составе фракции моноклеаров или выделены из нее как самостоятельная популяция, а также от наличия в прошлом или настоящем у женщины беременности [8]. НК-клетки по-разному управляют ангиогенезом в совместной культуре эндотелиальных клеток и клеток трофобласта в случае их дистантного и контактного сокультивирования [9]. Клетки трофобласта, в зависимости от цитокинового микроокружения, воздействующего как на НК-клетки, так и на сам трофобласт, по-разному влияют на адгезию и трансмиграцию НК-клеток через собственный монослой [6, 10].

Таким образом, регуляция функции трофобласта и НК-клеток носит взаимный характер. Несмотря на интенсивные исследования, роль НК-клеток и методы коррекции их функциональной активности в репродукции остаются спорными. При этом до сих пор преобладают представления об их антагонистических взаимоотношениях, связанных со способностью НК-клеток к цитотоксическому действию на трофобласт.

Ранее нами были получены данные о влиянии микровезикул НК-клеток на функциональное состояние клеток трофобласта в системе *in vitro* [11]. Было установлено, что микровезикулы снижают пролиферативную активность клеток трофобласта, не изменяя соотношения фосфорилированных и нефосфорилированных форм киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2), которое характеризует вовлеченность сигнального пути MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase) в этот процесс. При этом влияние содержимого самих НК-клеток на интенсивность пролиферации клеток трофобласта нами не изучалось. Указанный методологический подход мог бы дополнить полученные ранее данные о взаимодействии НК-клеток и клеток трофобласта как при контактном, так и при дистантном взаимодействии (секреция биологически активных продуктов и продукция микровезикул), моделируя процессы, происходящие *in vivo*. Изучение роли белкового состава клеток в межклеточных взаимодействиях может способствовать лучшему пониманию потенциальной роли тех или иных клеточных популяций в физиологических и патологических процессах, опосредованных различными способами межклеточной коммуникации.

Таким образом, целью данного исследования явилось изучение влияния белковых фракций лизата НК-клеток, полученных в результате микропрепаративного хроматографического разделения, на пролиферацию клеток трофобласта в модельном эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы

Культуры клеток. В качестве НК-клеток использовали клетки линии NK-92 (American Type Culture Collection, США), а в качестве объекта воздействия использовали клетки трофобласта линии JEG-3 (American Type Culture Collection, США). Для культивирования клеток линии NK-92 использовали полную ростовую среду, содержащую среду Minimum Essential Medium Eagle α -модификации с добавлением 12,5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 12,5% инактивированной лошадиной сыворотки, 0,2 мМ мио-инозитола, 0,02 мМ фолиевой кислоты, 2 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 Ед/мл пенициллина, 20 мМ буфера HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-

этансульфоновая кислота), 0,1 мМ меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Клетки линии JEG-3 культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle's Medium с добавлением 10% инактивированной ЭТС, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 Ед/мл пенициллина, 0,5 мМ L-глутамина, 1 мл Minimum Essential Medium, 1 мМ пирувата натрия (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Все эксперименты проводили при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи раствора трипанового синего (Sigma-Aldrich Chem. Co., США), при этом она составляла не менее 96%.

Индукторы. В качестве индукторов клеток трофобласта линии JEG-3 использовали белковые фракции, полученные в результате разделения лизата клеток линии NK-92 с помощью метода микропрепаративной эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого давления (см. ниже).

Приготовление биоматериала. В настоящей работе был использован оригинальный метод разрушения клеточных мембран [12]. Культуральную среду, содержащую клетки линии NK-92, центрифугировали при 500g (комнатная температура, 10 мин), осадок собирали и трижды промывали охлажденным фосфатным буфером Phosphate-Buffered Saline (0,01 M; pH 7,4) (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Очищенный осадок ресуспендировали в деионизированной воде стандарта MilliQ с добавлением коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в концентрациях, указанных изготовителями, и хранили при -80°C до анализа. В день эксперимента клетки размораживали и подвергали пятикратному повторному замораживанию-оттаиванию, после чего интенсивно гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в течение 5 мин. Полученный материал центрифугировали при 19800g (4°C, 20 мин), а полученный супернатант отбирали для дальнейшего исследования.

Препаративная хроматография. Для разделения тотального лизата $5,4 \times 10^7$ клеток на белковые фракции (субфракции цитоплазматической фракции) использовали хроматограф жидкостной 1260 Agilent Technologies Infinity II с программным обеспечением OpenLAB CDS ChemStation (Agilent Technologies, Inc., США). Хроматографическое разделение проводили в неденатурирующих условиях на колонке Agilent Bio SEC-3 Size Exclusion Column, 3 μ m, 300Å, 4,6×300 мм, (Agilent Technologies, Inc., США). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду. Анализ проводили в изократическом режиме при температуре +4°C со скоростью потока подвижной фазы 0,35 мл/мин. В качестве детектора использовали диодную матрицу, регистрирующую поглощение при 210 и 230 нм. Время анализа составило 45 мин. Ввиду непрерывности хроматографического профиля деление на фракции осу-

шествовалось в режиме *time-line* по временным отрезкам длительностью 3 мин, начиная с 6-й мин (с 24-й мин в подвижной фазе после выхода из хроматографической колонки и последующего концентрирования общий белок не обнаруживался, что позволило исключить данный материал из последующей работы). В результате эксперимента было проведено 15 итераций деления. Полученные фракции концентрировали на вакуумном испарителе CentriVap Vacuum Concentrator (Labconco Corp., США) до объема, в котором концентрация общего белка превышала значение 5 мг/мл. Полученные концентраты стерилизовали пропусканием через шприцевые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (Corning Inc., США), замораживали при -80°C и хранили до проведения анализа не более 2 нед.

Спектрофотометрия. Содержание общего белка в клеточных лизатах и белковых фракциях определяли по методу Бредфорда, используя спектрофотометр NanoDrop One (Thermo Scientific, США).

Электрофорез. Образцы белковых фракций лизата клеток линии NK-92 с равным количеством общего белка разделяли по молекулярным массам в 10%-ном полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в денатурирующих условиях по методу Лэммли.

Оценка цитотоксичности подвижной фазы для хроматографии и белковых фракций лизата клеток линии NK-92. Для определения минимальной токсической дозы подвижной фазы для хроматографии и полученных белковых фракций лизата клеток линии NK-92 в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 в лунки 96-луночного плоскодонного планшета для адгезионных культур (Becton Dickinson, США) вносили клетки линии JEG-3 в концентрации $3,5 \times 10^3$ клеток на лунку в 100 мкл полной культуральной среды (см. выше) с добавлением 10% ЭТС. Во избежание краевого эффекта в этом и всех последующих экспериментах с использованием планшетов крайние лунки по всему периметру заливали средой и не использовали в дальнейшем. Затем клетки культивировали в течение 24 ч в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO_2 . После этого клеткам заменяли культуральную среду на подвижную фазу для хроматографии или белковые фракции лизата клеток линии NK-92 в нескольких разведениях. Для этого путем последовательного титрования на полной культуральной среде с добавлением 10% ЭТС готовили серию разведений подвижной фазы или белковых фракций в концентрациях: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,20% и 0,10% (v/v). Для корректного статистического анализа каждое разведение препарата готовили в шести повторях. В качестве контроля использовали культуральную среду с добавлением 10% ЭТС. После этого клетки вновь культивировали в течение 24 ч в инкубаторе при 37°C во влажной атмосфере, 5% CO_2 .

Спустя сутки из всех лунок планшета удаляли среду и окрашивали клетки 0,2%-ным раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich Chem. Co., США), содержащим 5% метанола, для чего в каждую лунку вносили 100 мкл раствора красителя и инкубировали 10 мин. Затем, после четырехкратной отмытки лунок дистиллированной водой, планшет высушивали, а краситель экстрагировали добавлением в лунки 100 мкл 50%-ного раствора уксусной кислоты. Учет оптической плотности проводили на спектрофотометре ELx808 (BioTek Instruments Inc., США) при длине волны 540 нм (отсекающая длина волны 630 нм). О снижении жизнеспособности клеток судили по изменению оптической плотности анализируемой пробы по сравнению с контролем.

Оценка пролиферации. Для оценки влияния белковых фракций лизата клеток линии NK-92 на пролиферацию клеток трофобласта линии JEG-3 использовали метод, основанный на окраске белковых компонентов клеточной цитоплазмы витальным красителем кристаллическим фиолетовым (см. выше). Этот метод по чувствительности сопоставим с другими методами оценки пролиферации [13, 14]. Для этого клетки трофобласта помещали в лунки 96-луночного плоскодонного планшета с прозрачным плоским дном для адгезионных культур (Becton Dickinson, США) в концентрации $2,5 \times 10^3$ клеток в 50 мкл полной культуральной среды, дополненной 10% ЭТС, на лунку и оставляли в течение 24 ч для прикрепления клеток к поверхности планшета.

Через сутки после начала культивирования из всех лунок планшета среду удаляли. Затем в лунки с клетками добавляли 100 мкл растворов индукторов, приготовленных на культуральной среде без добавления раствора ЭТС с конечным содержанием каждого индуктора: 0,05%; 0,025%; 0,0125%; 0,00625%; 0,00313%; 0,00156%; 0,00078%; 0,00039%. После этого в каждую лунку добавляли ЭТС в количестве, равном 2% от содержимого лунки. Крайние лунки заполняли теплым (37°C) раствором Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich Chem. Co., США).

После инкубации в течение 72 ч культуральную среду из всех лунок удаляли и клетки окрашивали 0,2%-ным раствором кристаллического фиолетового, содержащим 5% метанола. Интенсивность клеточной пролиферации оценивали по изменению оптической плотности окрашенных экстрактов, которую измеряли с помощью спектрофотометра ELx808 (BioTek Instruments Inc., США), как описано выше. Полученные значения оптической плотности сопоставляли с количеством клеток, используя кривую титрования, и результаты выражали в количестве клеток. Об изменении клеточной пролиферации судили по изменению как оптической плотности образца, так и количества клеток по сравнению с инкубацией в культу-

ральной среде, дополненной 2% ЭТС (контроль). Питательные среды, дополненные 10% ЭТС, использовали в качестве дополнительного контроля. Одна серия экспериментов включала в себя исследование влияния всех шести индукторов в восьми разведениях в четырех повторах. Независимо друг от друга было проведено три серии экспериментов.

Иммуноблоттинг. Прокультивированные клетки трофобласта линии JEG-3 лизировали в буфере Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (50 мМ Трис-НСl pH 8,1; 1% Тритон X-100; 0,1% додецилсульфата натрия; 0,5% дезоксихолата натрия; 150 мМ хлорида натрия), содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Sigma-Aldrich Chem. Co., США). Для осаждения клеточного дебриса пробы центрифугировали при 20000g (+4°C, 20 мин). Лизат клеток линии JEG-3 либо белковые фракции лизата клеток линии NK-92, содержащие по 50 мкг общего белка, разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в денатурирующих условиях по методу Лэммли и переносили на PVDF-мембрану (Bio-Rad, США). Мембраны блокировали 3%-ным водным раствором бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в буфере TBST (50 мМ Трис-НСl; 150 мМ хлорида натрия; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,5). Содержание белков в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к протенкиназе В (АКТ/ПКВ) (Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb), киназам, регулируемым внеклеточными сигналами (ERK1/2) (p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb), и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH (14C10) Rabbit mAb). Все антитела были приобретены у компании Cell Signaling Technology (США). Инкубацию проводили при +4°C в течение ночи. Далее, после инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1/1000; Bio-Rad, США), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминесценцию Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США). Мембраны сканировали в гель-документирующей системе ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad, США), интенсивность полос определяли при помощи программного обеспечения ImageLab Software (Bio-Rad, США). Полученные данные были нормализованы по содержанию общего белка в геле [15], определяемому с применением технологии stain-free (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Statistica и GraphPad Prism 8. Для проверки достоверности различий применяли непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Результаты на рисунках представлены в виде медианы, минимального и максимального значения.

Результаты и обсуждение

Использованные в настоящем исследовании клетки линии NK-92 позволяют воспроизвести *in vitro* основные биохимические процессы, происходящие в клетках *in vivo*, а клетки трофобласта линии JEG-3 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики клеток инвазивного трофобласта первого триместра беременности [16, 17].

Содержание общего белка в лизате клеток линии NK-92 составило $60,2 \pm 6,1$ мкг/10⁶ клеток. В результате микропрепаративного хроматографического разделения тотального лизата было получено шесть фракций.

Электрофоретическое разделение белков в полученных фракциях показало следующее распределение молекулярных масс с различной степенью обогащенности белком (данные указаны для белков с долей более 5% от общего количества белка во фракции): 36–250 кДа (фракция №1), 29–66 кДа (фракция №2), 47–62 кДа (фракция №3), 50 кДа (фракция №4), «не определено» (фракции №№5–6) (рис. 1).

Оценка минимальной токсической дозы подвижной фазы для хроматографии и белковых фракций лизата клеток линии NK-92 показала, что в неразведенном состоянии и разведении культуральной средой в соотношении 50% и 25% они токсичны в отношении клеток трофобласта линии JEG-3 (отличие от жизнеспособности интактных клеток: $p < 0,001$). В разведении культуральной средой в соотношениях 12,5%, 6,25% и во всех последующих разведениях подвижная фаза и белковые фракции не оказывали токсического воздействия на клетки трофобласта (отличие от жизнеспособности интактных клеток: $p > 0,05$).

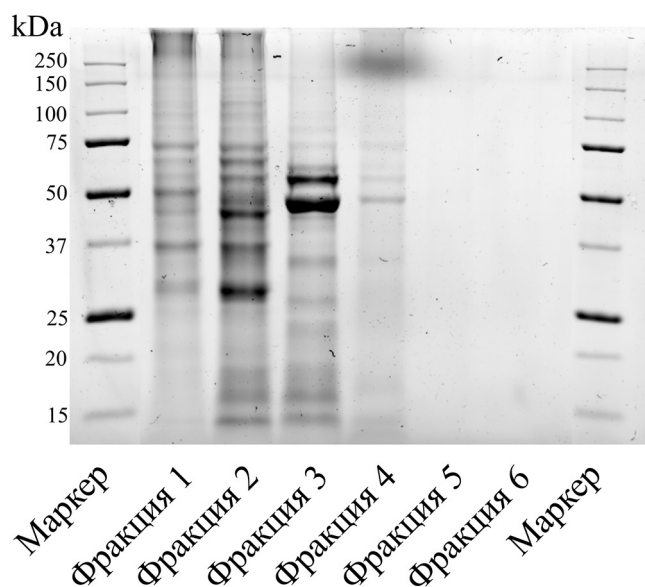


Рис. 1. Электрофореграммы белковых фракций лизата естественных киллеров линии NK-92.

В данной работе мы проанализировали влияние белковых фракций лизата НК-клеток на пролиферацию клеток трофобласта в условиях *in vitro* при использовании метода микропрепаративного хроматографического фракционирования и последующего культивирования клеток-мишеней в присутствии индукторов. В предварительном эксперименте, проведенном с целью проверки корректности получаемых данных, было показано, что пролиферация неактивированных клеток линии JEG-3, культивируемых в полной ростовой среде с добавлением 2% инактивированной

ЭТС (контроль), достоверно отличается от таковой клеток, культивируемых в отсутствие ЭТС (первый дополнительный контроль; $p < 0,001$) или в присутствии 10% ЭТС (второй дополнительный контроль; $p < 0,001$), что указывает на оптимально подобранные условия для последующих испытаний.

Установлено, что все исследованные фракции лизата клеток линии НК-92 в той или иной степени стимулируют пролиферацию клеток линии JEG-3 по сравнению с контролем (рис. 2): так, пролиферативная активность клеток-мишеней

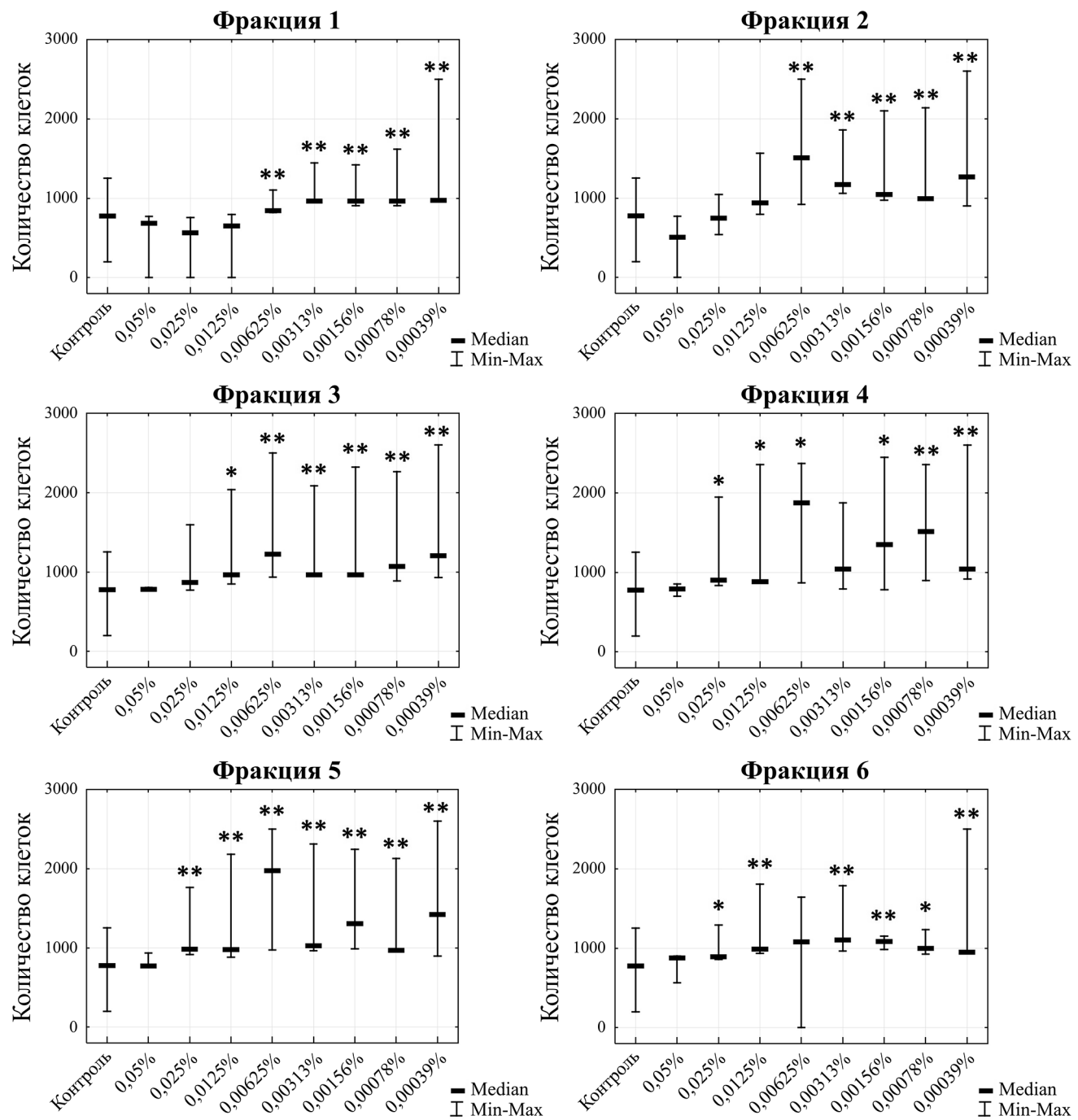


Рис. 2. Пролиферативная активность клеток трофобласта линии JEG-3 в присутствии фракций лизата естественных киллеров линии NK-92 ($n = 3$). Достоверность различий относительно контроля: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

повышалась в 1,16–2,42 раза после культивирования в присутствии индукторов с конечным содержанием их в лунке: 0,025% и менее (фракции №№4–6); 0,0125% и менее (фракция №3); 0,00625% и менее (фракции №№1–2). Наблюдаемый нами эффект может быть вызван тем, что в составе фракций, по-видимому, содержатся цитокины, усиливающие пролиферацию, такие как, например, IL-10 (IL, Interleukin) и IL-15 [18]. Полученные результаты согласуются с данными литературы о влиянии НК-клеток на ключевые процессы развития клеток трофобласта [19] и эндотелиальных клеток [20] в системах *in vitro*, причем в отношении последних наблюдались тонкие различия в эффектах, зависящих от способа передачи сигнала и от конкретной модели их изучения [21]. Ранее с помощью метода масс-спектрометрии в клетках линии НК-92 было обнаружено большое разнообразие цитокинов и рецепторов к ним – в частности, альфа-субъединица рецептора IL-15 (IL-15R α) [20], что свидетельствует в пользу активного влияния НК-клеток на функциональное состояние клеток микроокружения, формирующих область взаимодействия плода и матери.

Принимая во внимание данные об эффекте влияния всех исследуемых фракций лизата клеток линии НК-92 на пролиферативную активность клеток линии JEG-3 и учитывая относительно высокое содержание общего белка в первых фракциях, мы далее изучили распределение содержания белков АКТ/ПКВ и ERK1/2 во фракциях №№1–3, обнаруженных с помощью метода иммуноблоттинга (рис. 3).

Установлено, что основная доля исследуемых белков приходится на фракцию №2 (49,0% относительно общего содержания белка во фракциях №№1–3), при этом содержание каждого из исследуемых белков в доминирующей фракции превышало таковое во фракции №1 (в 2,35–2,56 раза) и фракции №3 (в 1,54–1,63 раза).

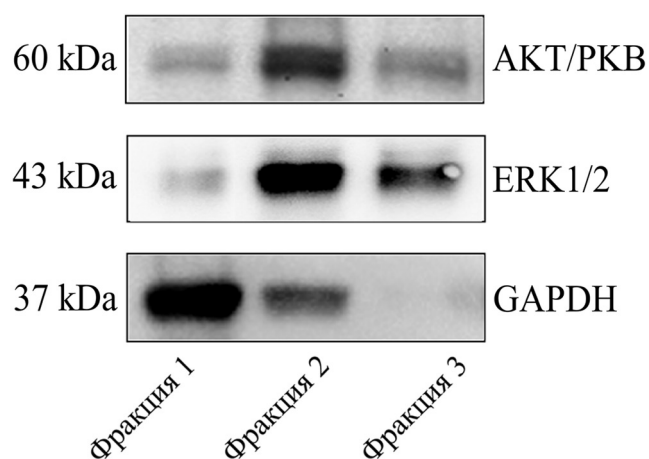


Рис. 3. Распределение содержания белков АКТ/ПКВ, ERK1/2 и GAPDH во фракциях №№1–3 лизата естественных киллеров линии НК-92.

Параллельно с этим установлено, что в первых трех фракциях лизата присутствуют маркеры пролиферации, в частности, АКТ/ПКВ и ERK1/2. При этом относительное содержание этих белков во фракции №2 было выше, чем во фракции №1 и фракции №3. Учитывая эффективность всех исследованных фракций в плане влияния на пролиферативную активность клеток трофобласта в проведенном эксперименте, можно предположить присутствие этих и/или других маркеров пролиферации и в остальных белковых фракциях. Необходимо отметить, что все без исключения исследованные фракции изначально представлены большим разнообразием белков, способных оказывать различные воздействия на клетку-мишень, порой противоположные по своему эффекту. Именно этим можно объяснить то, что первые три фракции, как наиболее обогащенные белком, проявляют свою доминирующую активность в отношении клеток трофобласта при относительно большем разведении, чем все последующие фракции.

Сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR (mTOR, mammalian target of rapamycin) в настоящее время признан одним из наиболее важных путей в регуляции выживания клеток. Активация этого пути дает клеткам сигнал выживания, который позволяет им противостоять апоптотическим каскадам [22]. АКТ/ПКВ оказывает прямое влияние на путь апоптоза – например, воздействуя на проапоптотический белок BAD, родственник Bcl-2. Он также влияет на транскрипционный ответ на апоптотические стимулы, например, воздействуя, на факторы FOX и активность семейства p53. Роль сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR в выживании клеток подчеркивается для некоторых видов рака [23].

Белки-члены семейства ERK являются серин/треониновыми протеинкиназами, ответственными за передачу митогенных сигналов [24]. Множественные стимуляторы, такие как факторы роста, цитокины, вирусы, лиганды рецепторов, связанных с G-белком, и онкогены активируют сигнальный путь RAF/MEK/ERK (RAF, rapidly accelerated fibrosarcoma). ERK1/2 регулируют активность различных факторов транскрипции посредством фосфорилирования, в конечном итоге регулируя клеточные метаболизм и функцию и влияя на специфические биологические эффекты клеток. Активация сигнальных путей ERK/MAPK активирует другие внеклеточные сигнальные пути [24]. Путь RAS/RAF/ERK усиливает активацию рецепторов смерти за счет увеличения экспрессии лигандов смерти, таких как TNF α (tumor necrosis factor α) или FasL, или рецепторов смерти, таких как Fas, DR4 или DR5 [25]. Активность ERK1/2 также способствует индукции FADD – адаптора каспазы-8 к рецепторам смерти [26]. Поскольку активация последней, опосредованная ERK, требует синтеза белка *de novo*, это может приводить к активации факторов транскрипции,

регулируемых ERK1/2, таких как c-Fos, что связано с активацией DR4 и DR5 [27].

Важной особенностью используемой нами экспериментальной модели является отсутствие образования иммунологического синапса, без которого активации ряда сигнальных путей в клетках трофобласта не происходит. Центральная MAP-киназа ERK локализована в цитоплазме, при этом многие из ее субстратов находятся в ядре. Для транслокации из цитоплазмы в ядро ERK использует специфический белок импортин 7 [28]. Стимуляция клеток цитокинами приводит к тому, что фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) способствует перемещению АКТ/ПКВ из цитозоля в состав липидных рафтов плазматической мембраны и активирует ее [29]. В литературе нам не удалось найти данные о возможности рецепции ERK или АКТ/ПКВ клетками из внеклеточной области. В то же время липофильность активированного АКТ/ПКВ теоретически может способствовать слиянию этого белка с поверхностными липидными рафтами на цитоплазматической мембране клетки. Полученные данные о наличии в лизате клеток линии НК-92 активных форм ERK и в особенности липофильного АКТ/ПКВ и о влиянии белковых фракций лизата на пролиферацию клеток трофобласта линии JEG-3 позволяют предположить участие сигнальных путей PI3K/АКТ/mTOR и RAF/MEK/ERK в пролиферативных каскадах клеток-мишеней в нашей модели. Данное предположение открывает необходимость дальнейшего изучения возможности передачи сигнала с помощью ERK1/2 и АКТ/ПКВ из внеклеточного матрикса.

Таким образом, представленные в настоящем исследовании данные об изменении пролиферативной активности клеток трофобласта линии JEG-3 под влиянием фракций лизата клеток линии НК-92 могут указывать на участие компонентов их внутриклеточного содержимого (АКТ/ПКВ и ERK1/2) в обеспечении коммуникации НК-клеток с клетками трофобласта. Сопоставление полученных данных с результатами предыдущих исследований позволяет предложить конкретные белки, которые могут быть также задействованы в данных процессах: кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, сфингозин-1-фосфатлиаза 1, хемокины CXС, профилин-3, α -катулин, релаксин-3 и др. Однако для уточнения иммунологических и биохимических механизмов, лежащих в основе этих процессов, необходимы дальнейшие исследования, направленные на идентификацию эффекторных белков НК-клеток, и прямые доказательства их связи с эффектами, наблюдаемыми при взаимодействии данного типа клеток с клетками микроокружения.

Изучение спектра белковых молекул лизатов НК-клеток, а также их биологической активности может способствовать пониманию потенциальных

путей реализации не только влияния этих клеток на трофобласт, но также и изменения их поведения под влиянием последнего. В дальнейшем эти механизмы реализуются с помощью как контактных, так и дистантных взаимодействий, включая секрецию цитокинов и продукцию внеклеточных везикул.

Заключение

В литературе в основном рассматриваются цитотоксические и эффекторные свойства НК-клеток, в том числе и в отношении трофобласта. Ранее нами был установлен факт прямой цитотоксичности НК-клеток в отношении клеток трофобласта [7]. В связи с этим можно полагать, что основной функцией НК-клеток является сдерживание избыточной пролиферации и миграции трофобласта. Ранее нами также было установлено, что НК-клетки по-разному управляют ангиогенезом в совместной культуре эндотелиальных клеток и клеток трофобласта в случае их дистантного и контактного сокультивирования [9]. Тем не менее, данных о прямом влиянии НК-клеток на пролиферацию трофобласта в литературе нам найти не удалось, что объясняется их прямой цитотоксичностью в моделях *in vitro* в отношении трофобласта. Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют в пользу влияния лизатов НК-клеток в отношении пролиферации трофобласта и ставят вопрос о создании экспериментальных моделей для подтверждения этих данных.

Полученные нами результаты гипотетически отражают поведение клеток хориона под влиянием НК-клеток в случае их гибели при физиологических и патологических состояниях, вызванных вирусными и бактериальными инфекциями, а также другими стрессорными факторами, приводящими к репродуктивной патологии. Проведенное исследование позволяет также оценить различия в данных по оценке влияния тех или иных биологически активных клеточных продуктов при межклеточных взаимодействиях, зависящих от способа передачи сигнала и от конкретной модели их изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект №1021062512052-5-3.2.2). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм и одобрены локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта (протокол заседания №114 от 14 декабря 2021 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов и выражают благодарность студентке Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета) Резюкиной В.А. за помощь в проведении исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milyutina Y.P., Mikhailova V.A., Pyatygina K.M., Demidova E.S., Malygina D.A., Tertychnaia T.E., Arutjunyan A.V., Sokolov D.I., Selkov S.A. Role of caspases in the cytotoxicity of NK-92 cells in various models of coculturing with trophoblasts. *Biochemistry (Mosc.)*. 2019;84(10):1186–1196.
2. Markova K., Mikhailova V., Milyutina Y., Korenevsky A., Sirotskaya A., Rodygina V., Tyshchuk E., Grebenkina P., Simbirtsev A., Selkov S., Sokolov D. Effects of microvesicles derived from NK cells stimulated with IL-1 β on the phenotype and functional activity of endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(24):13663.
3. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2017;92(2):100–114.
4. Михайлова В.А., Беякова К.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И. Особенности дифференцировки НК-клеток: CD56^{dim} и CD56^{bright} НК-клетки во время и вне беременности. *Мед. иммунол.* 2017;19(1):19–26.
5. Тышук Е.В., Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. Естественные киллеры: происхождение, фенотип, функции. *Мед. иммунол.* 2021;23(6):1207–1228.
6. Bazhenov D.O., Mikhailova V.A., Furaeva K.L., Vyaz'mina L.P., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. The role of cytokines in maintaining the dynamics of cell-cell interaction between natural killer cells and trophoblast cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2022;172(5):622–631.
7. Bazhenov D., Mikhailova V., Nikolaenkov I., Markova K., Salloum Z., Kogan I., Gzgyan A., Selkov S., Sokolov D. The uteroplacental contact zone cytokine influence on NK cell cytotoxicity to trophoblasts. *Gynecol. Endocrinol.* 2020;36(Suppl. 1):1–6.
8. Mikhailova V.A., Bazhenov D.O., Viazmina L.P., Agnaeva A.O., Bepalova O.N., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Cytotoxic activity of peripheral blood NK cells towards trophoblast cells during pregnancy. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;166(4):567–573.
9. Belyakova K.L., Stepanova O.I., Sheveleva A.R., Mikhailova V.A., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Interaction of NK cells, trophoblast, and endothelial cells during angiogenesis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;167(1):169–176.
10. Bazhenov D.O., Khokhlova E.V., Viazmina L.P., Furaeva K.N., Mikhailova V.A., Kostin N.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Characteristics of natural killer cell interaction with trophoblast cells during pregnancy. *Curr. Mol. Med.* 2020;20(3):202–219.
11. Sokolov D., Gorshkova A., Markova K., Milyutina Y., Pyatygina K., Zementova M., Korenevsky A., Mikhailova V., Selkov S. Natural killer cell derived microvesicles affect the function of trophoblast cells. *Membranes*. 2023;13(2):213.
12. Korenevsky A.V., Milyutina Y.P., Bochkovsky S.K., Oshkolova A.A., Bepalova O.N., Selkov S.A., Sokolov D.I. Micropreparative cell lysate fractionation in studying the effect of natural killer cells on phenotype, migration and apoptosis of trophoblast cells *in vitro*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2024;60(4):1385–1398.
13. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Пролиферативная активность эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 и ее модуляция. *Цитология*. 2005;47(5):393–403.
14. Nilles J., Weiss J., Theile D. Crystal violet staining is a reliable alternative to bicinchoninic acid assay-based normalization. *Biotechniques*. 2022;73(3):131–135.
15. Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Szewczyk N.J., Smith K., Atherton P.J. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2017;27(1):4–25.
16. Kohler P.O., Bridson W.E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1971;32(5):683–687.
17. Gong J.H., Maki G., Klingemann H.G. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*. 1994;8(4):652–658.
18. Гребенкина П.В., Михайлова В.А., Ошколова А.А., Вершинина С.О., Духинова М.С., Баженов Д.О., Сельков С.А., Соколов Д.И. Децидуальные естественные киллеры и клетки трофобласта: клеточные, гуморальные и молекулярные механизмы взаимодействия. *Мед. иммунол.* 2022;24(6):1085–1108.
19. Hanna J., Goldman-Wohl D., Hamani Y., Avraham I., Greenfield C., Natanson-Yaron S., Prus D., Cohen-Daniel L., Arnon T.I., Manaster I., Gazit R., Yutkin V., Benharroch D., Porgador A., Keshet E., Yagel S., Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat. Med.* 2006;12(9):1065–1074.
20. Korenevsky A.V., Gert T.N., Berezkina M.E., Sinyavin S.A., Mikhailova V.A., Markova K.L., Simbirtsev A.S., Selkov S.A., Sokolov D.I. Protein fractions of natural killer cell lysates affect the phenotype, proliferation and migration of endothelial cells *in vitro*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(Suppl. 1):S134–S150.
21. Korenevsky A.V., Berezkina M.E., Gert T.N., Sinyavin S.A., Selkov S.A., Sokolov D.I. Phenotypic and functional characteristics of endothelial cells: the *in vitro* effects of protein fractions from the lysate of natural killer-derived microvesicles. *Мед. иммунол.* 2022;24(3):463–480.
22. Li Q., Li Z., Luo T., Shi H. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK pathways for cancer therapy. *Mol. Biomed.* 2022;3(1):47.
23. Iida M., Harari P.M., Wheeler D.L., Toulany M. Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutat. Res.* 2020;819–820:111690.
24. Guo Y.J., Pan W.W., Liu S.B., Shen Z.F., Xu Y., Hu L.L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* 2020;19(3):1997–2007.
25. Ahmad J., Ahamad J., Algahtani M.S., Garg A., Shahzad N., Ahmad M.Z., Imam S.S. Nanotechnology-mediated delivery of resveratrol as promising strategy to improve therapeutic efficacy in triple negative breast cancer (TNBC): progress and promises. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2024;21(2):229–244.
26. Cagnol S., Van Obberghen-Schilling E., Chambard J.C. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis*. 2006;11(3):337–346.
27. Drosopoulos K.G., Roberts M.L., Cermak L., Sasazuki T., Shirasawa S., Andera L., Pintzas A. Transfor-

mation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 2005;280(24):22856–22867.

28. Maik-Rachline G., Hacohen-Lev-Ran A., Seger R. Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(5):1194.

29. Gao X., Zhang J. Akt signaling dynamics in plasma membrane microdomains visualized by FRET-based reporters. *Commun. Integr. Biol.* 2009;2(1):32–34.

Поступила в редакцию 24.07.2024

После доработки 24.09.2024

Принята в печать 03.10.2024

RESEARCH ARTICLE

Natural killer cell lysate fractions affect trophoblast cell proliferation *in vitro*

A.V. Korenevsky^{*} , Yu.P. Milyutina , S.K. Bochkovsky , D.I. Sokolov ,
S.A. Selkov , O.N. Beshpalova 

D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, Mendeleyevskaya Line 3, St. Petersburg, 199034 Russia
**e-mail: a.korenevsky@yandex.ru*

Placenta development is largely determined by the interaction of natural killer (NK) cells and trophoblast cells. Despite intensive research, the role of NK cells and methods for correcting their functional activity in reproduction remain controversial. The aim of this study was to investigate the effect of protein fractions of NK cell lysate on trophoblast cell proliferation in a model experiment *in vitro*. Chromatographic separation resulted in obtaining six cell lysate fractions with different sets of proteins (25–250 kDa). It was found that all the studied fractions stimulated trophoblast cell proliferation. Proliferation markers such as protein kinase B (AKT/PKB) and extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) were found in the protein fractions with molecular weights of 36–250 kDa, 29–66 kDa, and 47–62 kDa. The obtained data on the change in the proliferative activity of JEG-3 cells under the influence of the NK-92 cell lysate fractions hypothetically reflect the behavior of chorionic cells surrounded by NK cells in the event of their death under normal or pathological conditions caused by viral and bacterial infections, as well as other stress factors that lead to reproductive pathology.

Keywords: *reproduction, placenta, natural killer cells, trophoblast, proliferation, AKT/PKB, ERK1/2*

Funding: This study was performed under the state assignment of D.O. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, project number 1021062512052-5-3.2.2.

Сведения об авторах

Корневский Андрей Валентинович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биохимии репродукции и медико-экологических проблем НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: a.korenevsky@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0365-8532>

Милутина Юлия Павловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии репродукции и медико-экологических проблем НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: milyutina1010@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1951-8312>

Бочковский Сергей Константинович — студент лаборатории биохимии репродукции и медико-экологических проблем НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: serega86bochkovsky@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9555-7757>

Соколов Дмитрий Игоревич — докт. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: falcojugger@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5749-2531>

Сельков Сергей Алексеевич — докт. мед. наук, проф., руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: selkovsa@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1560-7529>

Бешпалова Олеся Николаевна — докт. мед. наук, зам. директора по научной работе НИИ АГиР им. Д.О. Отта. Тел.: 8-812-328-98-05; e-mail: shiggerra@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6542-5953>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 574.24

**Наночастицы городской пыли вызывают
провоспалительную активацию нейтрофилов и макрофагов****А.Н. Павлюченкова^{1, 2, 3} , Н.В. Воробьева⁴ , А.А. Дашкевич^{1, 2} , Л.А. Зиновкина^{1, 2} ,
А.И. Иванеев⁵ , М.С. Ермолин⁵ , П.С. Федотов^{1, 5} , Р.А. Зиновкин¹ ,
М.А. Челомбитко¹ , Б.В. Черняк^{1, *} **¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;²Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73;³Сектор эволюционной цитогеронтологии и ⁴кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;⁵Институт геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 19

*e-mail: bchernyak1@gmail.com

Частицы городской пыли служат важнейшим патогенным фактором при заболеваниях дыхательных путей, таких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких, а также повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и рака легких. Наночастицы (НЧ) различного происхождения являются важным компонентом городской пыли, однако их воздействие на организм человека практически не изучено. В настоящей работе было исследовано влияние НЧ городской пыли на клетки врожденного иммунитета, нейтрофилы и макрофаги *in vitro*. В работе были использованы НЧ, выделенные из образцов городской пыли с помощью метода проточного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке. Показано, что НЧ пыли вызывают статистически значимое повышение продукции активных форм кислорода в нейтрофилах человека. Преинкубация нейтрофилов с НЧ пыли приводила к четырехкратному усилению продукции активных форм кислорода в ответ на хемоаттрактантный пептид *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, что свидетельствует об эффекте праймирования нейтрофилов наночастицами. У макрофагов, полученных при дифференцировке клеток моноцитарной линии ТНР-1, НЧ пыли стимулировали секрецию провоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли и интерлейкина-6. Добавление антибиотика полимиксина В, способного связывать липополисахарид бактериальной стенки, снижало воспалительную активацию нейтрофилов и макрофагов. Полученные данные указывают на то, что провоспалительное действие НЧ городской пыли на нейтрофилы и макрофаги, по крайней мере отчасти, связано с присутствием в них липополисахарида бактериальной стенки.

Ключевые слова: наночастицы, городская пыль, клетки врожденного иммунитета, воспалительная активация, нейтрофилы, макрофаги

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-5

Введение

Городская пыль представляет собой сложный полидисперсный объект окружающей среды [1]. Частицы городской пыли образуются как в результате выветривания городских почв, так и в результате антропогенной деятельности (автомобильных и промышленных выбросов, строительства, переработки бытовых отходов и пр.) [2]. Они являются одним из важных экологических факторов, угрожающих здоровью человека, особенно при заболеваниях дыхательных путей, та-

ких как астма и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), а также повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и рака легких [3]. Эколого-эпидемиологические исследования, проведенные в городах России, подтвердили связь между содержанием частиц пыли в воздухе и заболеваемостью населения [4]. Важную роль в патогенном действии частиц пыли играет их взаимодействие с клетками врожденного иммунитета: нейтрофилами, макрофагами и тучными клетками.

© Павлюченкова А.Н., Воробьева Н.В., Дашкевич А.А., Зиновкина Л.А., Иванеев А.И., Ермолин М.С., Федотов П.С., Зиновкин Р.А., Челомбитко М.А., Черняк Б.В., 2024

Основную массу взвешенной в атмосфере пыли составляют микрочастицы размером менее 10 мкм (PM10) и 2,5 мкм (PM2.5). Микрочастицы пыли достаточно хорошо изучены, а их содержание в атмосфере контролируется во всех развитых странах мира. Значительно хуже изучены наночастицы (НЧ) городской пыли, имеющие размеры менее 100 нм. Их выделение и исследование осложнено вследствие крайне низкого содержания в окружающей среде. НЧ пыли обладают чрезвычайно высокой подвижностью в городских экосистемах [5, 6]. Они долгое время находятся во взвешенном состоянии в атмосфере, а также способны проникать глубоко в дыхательные пути и далее в кровоток. В крупных городах содержание НЧ городской пыли антропогенного происхождения может превышать содержание природных НЧ [7, 8]. Основными источниками НЧ городской пыли могут служить продукты изнашивания автомобильных покрышек и неполного сгорания топлива [9, 10]. Антропогенные НЧ содержат значительно больше токсичных и потенциально токсичных элементов, таких как тяжелые металлы (Pb, Cd, Cu, Ni), в сравнении с микрочастицами пыли [11, 12]. Кроме того, НЧ пыли обладают очень высокой сорбционной активностью и способны сорбировать компоненты бактерий, грибов, пыльцы растений и других биологических объектов. При исследовании микрочастиц городской пыли было показано, что токсичность и провоспалительное действие частиц летней пыли существенно выше, чем у частиц, собранных зимой [13], что, видимо, связано с более высоким содержанием биологических компонентов.

К настоящему времени взаимодействие НЧ с клетками изучается исключительно на примерах искусственных НЧ. В частности, показано, что НЧ оксидов титана, церия и цинка вызывают активацию НАДФН-оксидазы и дегрануляцию нейтрофилов [14, 15]. Эти же НЧ [16], а также НЧ диоксида кремния [17] и углеродные НЧ [18] вызывают воспалительную активацию макрофагов.

Нейтрофилы играют важную роль в патогенезе легочных заболеваний, связанных с загрязнением атмосферы [19]. Они являются наиболее многочисленными лейкоцитами крови и быстро рекрутируются в очаги воспаления. При стимуляции различными физиологическими и нефизиологическими агентами в них активируется НАДФН-оксидаза, что ведет к массивному выбросу активных форм кислорода (АФК) и образованию хлорноватистой кислоты (НОСl). В присутствии АФК переходные металлы (в особенности железо), содержащиеся в частицах пыли, могут катализировать реакцию Фентона, в которой образуется чрезвычайно активный окислитель гидроксид-анион-радикал, повреждающий окружающие ткани. При гиперактивации нейтрофилов они способны выбрасывать из клетки декон-

денсированный хроматин, который образует внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps, NETs). Выброс этих ловушек сопровождается некротической гибелью клеток, НЕТОзом, который, наряду с защитными функциями, участвует в развитии тромбоза и других патологий [20].

Наряду с нейтрофилами, макрофаги относятся к клеткам врожденного иммунитета. Они являются частью системы мононуклеарных фагоцитов, куда помимо них входят также их костномозговые предшественники, циркулирующие моноциты и дендритные клетки. Тканевые, или резидентные, макрофаги расположены практически во всех органах человека, где они фагоцитируют патогены и погибшие клетки, тем самым играя критическую роль в поддержании тканевого гомеостаза [21]. Альвеолярные макрофаги, перитонеальные макрофаги и клетки Купфера в печени первыми реагируют на патогены, поступающие в организм с вдыхаемым воздухом или через пищеварительный тракт. Активация макрофагов происходит за счет распознавания патогенов специфическими рецепторами, расположенными как на поверхности клетки (10 Толл-подобных рецепторов, TLR), так и в цитоплазме (22 НОД-подобных рецептора (NLRs), а также рецепторы РНК и ДНК). Взаимодействие этих рецепторов со своими лигандами запускает различные сигнальные пути, ведущие к воспалительной активации макрофагов [22]. Воспалительная активация макрофагов ведет к выбросу АФК, усилению фагоцитарной активности, синтезу и секреции многочисленных провоспалительных цитокинов и других медиаторов, которые во многом определяют течение воспалительного процесса.

В настоящей работе была исследована реакция нейтрофилов и макрофагов человека на присутствие НЧ городской пыли. В работе были использованы НЧ, выделенные из образцов городской пыли с помощью метода проточного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке.

Материалы и методы

Выделение НЧ пыли. Работа была выполнена на образце пыли, собранном летом 2023 г. в Москве с поверхностей на территории, прилегающей к третьему транспортному кольцу, как описано ранее [23]. Для выделения и концентрирования НЧ городской пыли было использовано сочетание метода проточного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке (ВСК) и метода мембранной фильтрации [11, 24]. ВСК представляет собой трубку из политетрафторэтилена с внутренним диаметром 1,6 мм и внутренним объемом 20 мл, намотанную на сердечник планетарной центрифуги. Для выделения НЧ готовили суспензию из 1 г пыли в 10 мл воды, далее полученную суспензию вводили в ВСК. Выделение НЧ проводили при скорости вращения центрифуги

800 об./мин и скорости потока жидкости-носителя 0,3 мл/мин. При данных условиях разделения из колонки элюируются НЧ, а более крупные частицы удерживаются в колонке. Средняя масса НЧ, извлеченных из 1 г городской пыли, составляла $0,42 \pm 0,15$ мг. Для концентрирования НЧ использовали ультрафильтрацию на целлюлозных мембранных фильтрах Millipore (Merck, Германия) с диаметром пор 50 нм. Фильтры с НЧ обрабатывали в течение 5 мин в ультразвуковой бане и в полученную суспензию добавляли концентрированный фосфатно-солевой буфер (ФСБ; Sigma, США) для получения изотонического раствора.

Воду для получения НЧ и экспериментов готовили с помощью системы Milli-Q® (Merck, Германия) снабженной гидрофильными мембранными фильтрами Millipak® 0,22 мкм. В воде полностью отсутствовали НЧ, что было подтверждено методом динамического светорассеяния.

Для исключения бактериальной контаминации суспензию НЧ обрабатывали ультрафиолетовым светом с помощью УФ-лампы «Кристалл БНБ 01-11-001» (Россия) в течение 5 мин. Стерильность полученных НЧ подтверждали с помощью контрольных посевов (4 сут, 5% CO₂, 37°C) в среде RPMI 1640 с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, FBS, Панэко, Россия).

Определение размерного распределения НЧ пыли. НЧ городской пыли имеют тенденцию к агрегации, и добавление ФСБ усиливает эту тенденцию из-за увеличения ионной силы. Для предотвращения агрегации к суспензии НЧ перед добавлением ФСБ добавляли концентрированный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА; Sigma, США) до финальной концентрации 0,2%. Размерное распределение частиц и дзета-потенциал выделенных НЧ в суспензии, содержащей 0,2% БСА, измеряли методом динамического светорассеяния на анализаторе размеров НЧ Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания).

Для определения содержания липополисахаридов (ЛПС) бактериальной стенки в суспензии НЧ использовали LAL-тест, основанный на реакции лизата клеток крови (амебоцитов) мечехвостов рода *Limulus* с ЛПС. Наборы для хромогенного LAL-теста Lonza Kinetic-QCL (Fisher Sci., США) использовали согласно инструкции производителя.

Выделение первичных нейтрофилов человека. Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. Образцы крови были получены с добровольного согласия доноров в отделении переливания крови Российской детской клинической больницы ФГБОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Донорами являлись здоровые мужчины

в возрасте 25–30 лет. Периферическую кровь забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином. Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугауе (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре, как описано ранее [25]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстране. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом (0,2%-ном) растворе NaCl в течение 30 с и далее восстанавливали изотоничность путем добавления 1,6%-ного раствора NaCl. Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI 1640, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамин и 1%-ную инактивированную нагреванием FBS. Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла не менее 99%, что определяли по исключению 0,1%-ного трипанового синего. Нейтрофилы перед экспериментами инкубировали в течение 1 ч при температуре 4°C, а затем использовали в течение 3 ч.

Оценка влияния НЧ на образование АФК в нейтрофилах. Для оценки накопления суммарных АФК (внутри- и внеклеточных) при активации нейтрофилов использовали метод регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции, как описано ранее [25, 26]. Свежевыделенные нейтрофилы ($4,25 \times 10^5$ клеток) инкубировали в ПКС с 8%-ной FBS (HyClone, США) и 0,04% БСА в течение 40 мин при 37°C и 5% CO₂. В среду инкубации добавляли 1 нг/мл ЛПС, 40 мкг/мл НЧ или 40 мкг/мл НЧ в комбинации с 10 мкг/мл полимиксина В (ПМВ). Далее ПКС заменяли на фосфатный буфер Кребса-Рингера (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,7 mM KH₂PO₄, 8,3 mM Na₂HPO₄, 10 mM глюкоза, 1 mM CaCl₂, 1,5 mM MgCl₂, pH 7,3). К 2×10^5 клеток добавляли люминол (конечная концентрация, 80 мкМ) и проводили регистрацию окислительного взрыва. Для изучения эффекта праймирования НЧ пыли (40 мкг/мл) добавляли к нейтрофилам человека за 40 мин до начала измерения хемилюминесценции, стимулированной 800 нМ fMLP. 10 мкг/мл ПМВ добавляли одновременно с НЧ за 40 мин до стимуляции fMLP. В контрольных экспериментах вместо НЧ добавляли тот же объем буфера, в котором они были суспендированы. Люминесценцию анализировали сразу после стимуляции при 37°C в планшетном хемилюминометре Lucy 1 (Anthos Labtec, Австрия).

Оценка влияния НЧ на воспалительную активацию макрофагов. Исследования проводили на макрофагах, полученных при дифференцировке клеток моноцитарной линии THP-1. Данная клеточная линия получена от пациента с острым моноцитарным лейкозом и широко применяется в исследованиях по изучению механизмов воспалительной активации макрофагов и оценке противовоспалительной активности различных соеди-

нений [27, 28]. Данная клеточная линия уже использовалась для оценки действия разных типов НЧ на макрофаги [29–31]. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 0,3 г/л L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10%-ным содержанием FBS (HyClone, США). Для экспериментов клетки в концентрации 500 тыс. клеток/мл высевали на 12-луночные планшеты для адгезионных культур (NEST, Китай), добавляли 100 нМ форболового эфира (Sigma, США) для дифференцировки и инкубировали 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Дифференцированные клетки инкубировали с 40 мкг/мл НЧ или 5 нг/мл ЛПС (*E. coli* 0127:B8, Sigma, США) в течение 24 ч с добавлением или без добавления 10 мкг/мл ПМВ (Джодас Экспоим, Россия). Содержание провоспалительных цитокинов определяли в культуральной среде после центрифугирования. Уровни фактора некроза опухоли (ФНО), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) определяли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Сравнение между несколькими экспериментальными группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони. Данные на рисунках представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего пяти независимых экспериментов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Размерное распределение НЧ пыли. Распределение по размерам НЧ пыли, полученных методом проточного фракционирования частиц во вращающейся спиральной колонке, определяли методом динамического светорассеяния. Оценивали численное распределение (аналог молярной концентрации растворов) или объемное распределение (аналог весовой концентрации растворов) частиц в суспензиях. Размеры большей части частиц (95% по массе) составляли 110–130 нм. Кроме того, в выделенной фракции присутствовало небольшое количество частиц (менее 5% по массе) со средним размером 300 нм. Таким образом, выделенные частицы с небольшим допущением можно считать фракцией НЧ. Размерное распределение частиц практически совпадало с таковым для образцов, описанных ранее [23]. В первом случае средний размер НЧ составил 120 нм, а во втором – 220 нм. Содержание агрегатов с размером более 300 нм было незначительным. Измерения дзета-потенциала НЧ показали, что его среднее значение составляет -20 мВ, что объясняет

склонность НЧ к агрегации, которая наблюдалась в эксперименте. Агрегация НЧ ускорялась в среде с высокой ионной силой и предотвращалась в присутствии БСА. Распределение НЧ по размерам в присутствии альбумина менялась незначительно. Суспензия НЧ в присутствии 0,2% альбумина была стабильна при хранении при 4°C – по крайней мере, в течение 2 нед. Альбумин использовался ранее для стабилизации суспензии искусственных НЧ различной природы [32].

Содержание ЛПС бактериальной стенки в НЧ городской пыли. При анализе содержания ЛПС бактериальной стенки в суспензии НЧ, проведенном с помощью LAL-теста, были получены значения в диапазоне 300–400 EU/мг. Международные эндотоксиновые единицы (EU) отражают биологическую активность ЛПС, и одна EU соответствует 0,1–0,2 нг ЛПС в зависимости от типа. Соответственно, содержание ЛПС в образцах НЧ пыли может варьировать в интервале 30–80 нг/мг. Ранее сообщалось, что присутствие НЧ оксидов Cu, Ti и Si может нарушать точность измерений ЛПС с помощью LAL-теста, особенно при высокой концентрации НЧ [33]. В наших измерениях НЧ пыли использовались в значительно более низких концентрациях. Следует отметить, что LAL-тест реагирует не только с ЛПС, но также и с компонентами оболочки грибов, бета-1,3-глюканами. Требуется дополнительные исследования для выяснения того, какие еще органические соединения, помимо ЛПС, присутствуют в НЧ пыли.

Для проверки возможного участия ЛПС в биологических эффектах НЧ пыли был использован пептидный антибиотик ПМВ, который способен связывать ЛПС [34]. Добавление 10 мкг/мл ПМВ вызывало значительное снижение абсолютного значения дзета-потенциала с -20 мВ до -13 мВ, что подтверждает его связывание с НЧ и нейтрализацию отрицательного заряда ЛПС. В то же время, ПМВ не вызывал заметной агрегации НЧ. Природа связывания ЛПС с НЧ пыли неизвестна. Возможно, ЛПС связывается с НЧ непрочно, образуя так называемую «корону». Образование короны при взаимодействии НЧ с белками, липидами и другими биологически активными макромолекулами было подробно исследовано применительно к искусственным НЧ [35–37]. В частности, было показано образование короны при взаимодействии НЧ TiO₂ с ЛПС в присутствии сыворотки крови [38]. В то же время, сообщалось, что связывание ЛПС с поверхностью НЧ золота вызывало снижение образования короны при инкубации в плазме крови [39]. Необходимо проведение дополнительных исследований для выяснения механизмов связывания ЛПС и НЧ пыли.

Активация нейтрофилов под действием НЧ пыли. Основным источником АФК в нейтрофилах является НАДФН-оксидаза, локализованная в специфических гранулах и плазматической мем-

бране клеток [40]. Активация НАДФН-оксидазы происходит либо при связывании специфических лигандов с рецепторами, либо при повышении проницаемости плазматической мембраны с последующим повышением концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме. Примером первого механизма активации служит взаимодействие нейтрофилов с хемоаттрактантным пептидом fMLP, который входит в состав бактериальных белков. На рис. 1 видно, что добавление fMLP к нейтрофилам вызывает повышение продукции АФК, измеренное по усилению хемилюминесценции люминола.

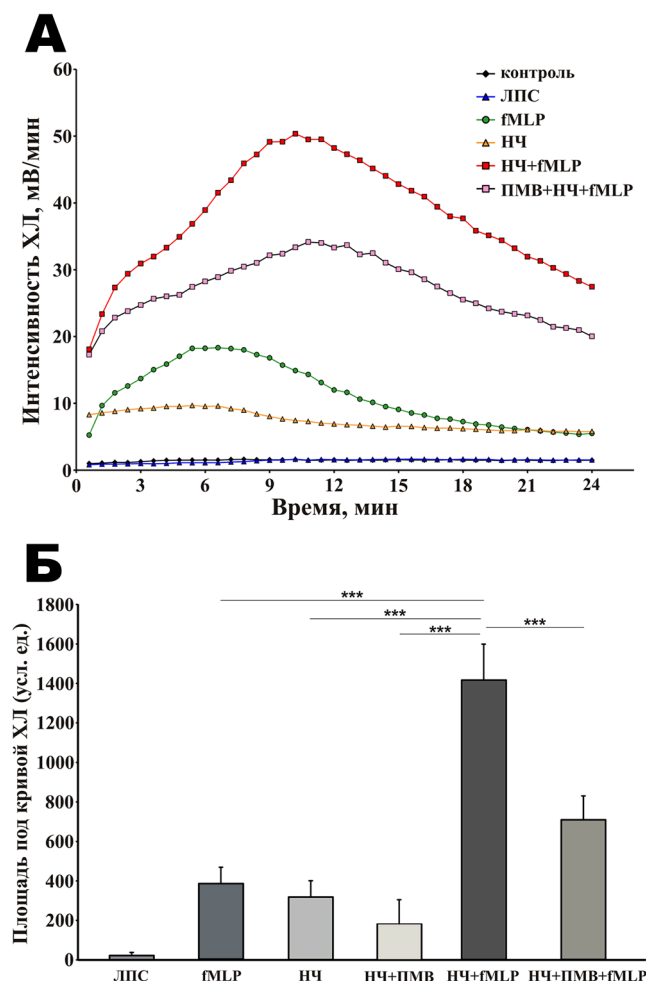


Рис. 1. Активация образования активных форм кислорода (АФК) в нейтрофилах человека под действием наночастиц (НЧ) пыли и fMLP. Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии 1 нг/мл ЛПС, 40 мкг/мл НЧ пыли или 40 мкг/мл НЧ пыли с 10 мкг/мл полимиксина В (ПМВ) в течение 40 мин (37°C, 5% CO_2) и регистрировали люминол-зависимую хемилюминесценцию. Для изучения эффекта праймирования НЧ пыли (40 мкг/мл) добавляли к нейтрофилам человека за 40 мин до начала измерения хемилюминесценции, стимулированной 800 нМ fMLP. 10 мкг/мл ПМВ добавляли одновременно с НЧ. (А) Типичные кинетические кривые хемилюминесценции. По оси абсцисс: время, мин. По оси ординат: интенсивность хемилюминесценции, мВ/мин. (Б) Эмиссия света, индуцированная активаторами окислительного взрыва, выраженная в виде площади под кривыми хемилюминесценции; $n = 5$; *** — $p < 0,001$. Сокращения: ЛПС, липополисахарид; НЧ, наночастицы пыли; fMLP, *N*-формил-метионил-лейцил-фенилаланин; ПМВ: ХЛ, хемилюминесценция.

Добавление НЧ пыли к нейтрофилам вызвало усиление продукции АФК, близкое по величине к эффекту fMLP (рис. 1). Добавление 10 мкг/мл пептидного антибиотика ПМВ, который способен связывать ЛПС [34], существенно снизило эффект НЧ, что указывает на участие ЛПС в активации нейтрофилов. Однако очищенный препарат ЛПС не вызывал заметного повышения АФК (рис. 1), что согласуется с литературными данными [41].

Предположение о том, что ПМВ вызывает агрегацию НЧ, не подтвердилось данными динамического светорассеяния. Можно предположить, что ЛПС, сорбированный на НЧ, приобретает особые свойства. Возможно также, что действие НЧ пыли зависит от других биологических компонентов — в частности, бета-глюканов из клеточной стенки грибов, связывающихся с ПМВ. Стоит отметить, что растворимые бета-глюканы не способны активировать продукцию АФК в нейтрофилах [42], так что и в этом случае сорбция на НЧ может изменять свойства молекулы.

Дальнейшие эксперименты на нейтрофилах человека были направлены на проверку возможного эффекта «праймирования» под действием НЧ пыли. Праймирование нейтрофилов наблюдается при продолжительной преинкубации клеток с различными цитокинами и иными факторами и приводит к значительному усилению последующей активации — например, под действием fMLP [43]. Для изучения эффекта праймирования нейтрофилы инкубировали с 40 мкг/мл НЧ в течение 40 мин, а после перевода клеток в буфер Кребса-Рингера стимулировали окислительный взрыв 800 нМ fMLP. Преинкубация нейтрофилов человека с НЧ пыли приводила к четырехкратному усилению ответа клеток на fMLP (рис. 1). Одним из природных компонентов микробного происхождения, которые способны вызывать праймирование нейтрофилов, является ЛПС [41]. Для проверки его возможного участия в праймировании под действием НЧ пыли был использован ПМВ. Ранее было показано, что он подавляет праймирование нейтрофилов под действием ЛПС [44]. В наших экспериментах (рис. 1) добавление ПМВ частично предотвращало эффект праймирования под действием НЧ пыли. Таким образом, праймирование нейтрофилов под действием НЧ пыли отчасти может быть связано с присутствием в них ЛПС.

Инфицирование грамотрицательными бактериями, клеточные стенки которых содержат ЛПС, является глобальной проблемой, особенно для людей с ослабленным иммунитетом. ЛПС является одним из основных факторов, вызывающих острую воспалительную реакцию. При попадании в кровоток он вызывает симптомы септического шока, такие как расширение сосудов, и полиорганную недостаточность. Праймирование нейтрофилов под действием ЛПС приводит к их гиперактивации низкими дозами других активаторов,

таких как fMLP, что приводит к повреждению тканей при воспалении.

Активация макрофагов под действием НЧ пыли.

Исследования воспалительной активации макрофагов под действием НЧ городской пыли проводили на макрофагах, полученных при дифференцировке клеток моноцитарной линии THP-1. Данная клеточная линия широко применяется в исследованиях по изучению механизмов воспалительной активации макрофагов и, в частности, для оценки провоспалительного действия разных типов искусственных НЧ [29–31]. В качестве маркеров воспалительной активации была исследована секреция основных провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-1 β .

Результаты измерения уровня ФНО и ИЛ-6 в инкубационной среде показали, что НЧ вызывают их секрецию макрофагами (рис. 2). ПМВ частично снижал эффект действия НЧ на секрецию обоих цитокинов. Очищенный ЛПС также стимулировал секрецию ФНО и ИЛ-6, и его эффект полностью блокировался ПМВ. Эти данные позволяют предположить, что провоспалительное действие НЧ на макрофаги отчасти обусловлено присутствующим в них ЛПС. В то же время, либо сами НЧ, либо сорбированные на них иные биологические компоненты также стимулируют воспалительную активацию макрофагов.

Активация макрофагов ЛПС инициируется взаимодействием с TLR4 и образованием ЛПС-связывающего комплекса с CD14 и MD-2 на клеточной поверхности. Затем с помощью адапторных молекул происходит активация различных проте-

инкиназ и фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), что в конечном итоге приводит к активации NF- κ B, его транслокации в ядро и последующей транскрипции воспалительных цитокинов, в первую очередь – ФНО и ИЛ-6 [45].

Как показали результаты анализа содержания ИЛ-1 β , ни ЛПС, ни НЧ не стимулируют его секрецию макрофагами (рис. 2). Однако неожиданно оказалось, что НЧ в сочетании с ПМВ стимулирует секрецию ИЛ-1 β .

Трансляция ИЛ-1 β приводит к синтезу неактивного предшественника. Созревание ИЛ-1 β происходит путем протеолитического расщепления предшественника под действием каспазы-1. Активация каспазы-1, в свою очередь, происходит в составе многокомпонентного комплекса инфламасомы NLRP3 [46]. Для активации инфламасомы в макрофагах недостаточно воздействия ЛПС. ЛПС-зависимая активация NF- κ B приводит лишь к экспрессии и накоплению предшественника ИЛ-1 β и компонентов инфламасомы. Вторым сигналом, необходимым для активации инфламасомы, могут служить самые различные агенты – в том числе, внеклеточные молекулы АТФ, порообразующие токсины, кристаллы мочевой кислоты, пирофосфата кальция и холестерина и т.д. Известно, что ПМВ в концентрациях >20 мкг/мл может активировать в макрофагах NLRP3 инфламасому, ответственную за продукцию зрелого ИЛ-1 β [47]. Возможно, ПМВ в более низкой концентрации в комбинации с НЧ пыли формирует подобный «второй сигнал» для активации инфламасомы.

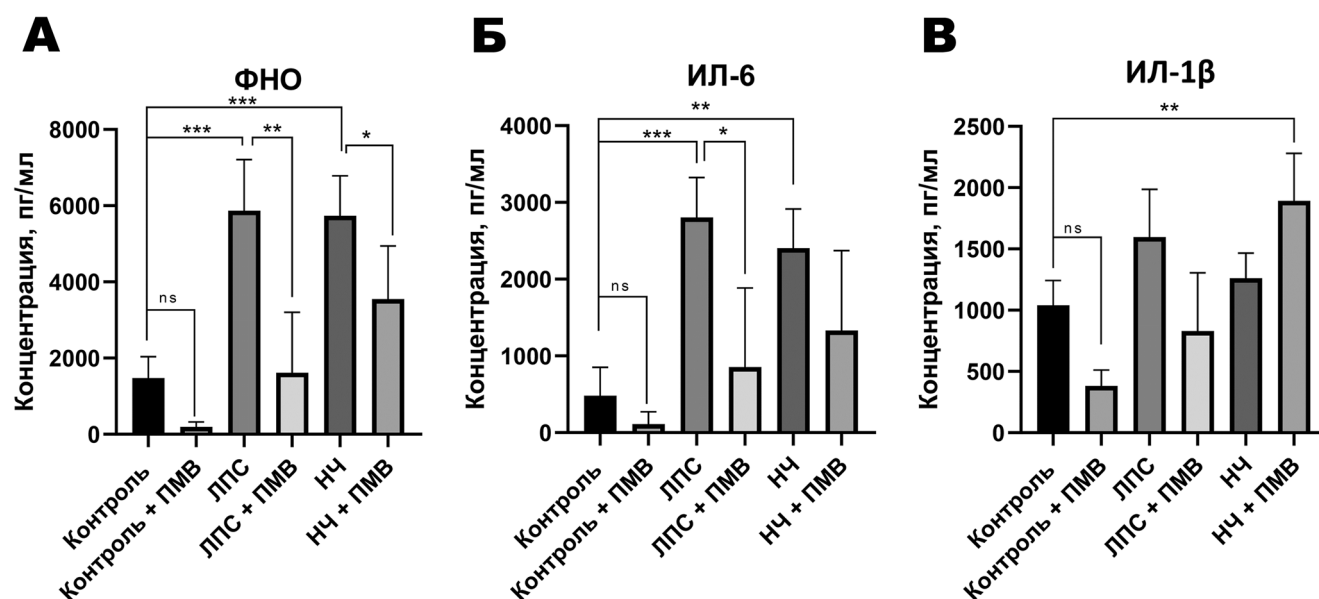


Рис. 2. Влияние наночастиц (НЧ) пыли на секрецию цитокинов воспаления в макрофагах человека. К стимулированным к дифференцировке с помощью форболового эфира клеткам линии THP-1 добавляли 40 мкг/мл НЧ или 5 нг/мл ЛПС и проводили инкубацию в течение 24 ч с 10 мкг/мл полимиксина В (ПМВ). В супернатанте, полученном после центрифугирования кондиционированной среды, измеряли содержание цитокинов с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа. Гистограммы отражают содержание ФНО (А), ИЛ-6 (Б) и ИЛ-1 β (В). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; $n = 5$; * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$, *** – $p \leq 0,001$.

Воспалительная реакция является защитной, однако чрезмерная выработка ИЛ-1 β , ФНО и ИЛ-6 вызывает острую воспалительную реакцию, которая характерна, в частности, для респираторных заболеваний [22, 48]. Содержание цитокинов ИЛ-1 β , ФНО и ИЛ-6 повышено в мокроте и бронхоальвеолярном смыве у пациентов с астмой и ХОБЛ, а их уровень коррелирует с тяжестью заболевания, что отражает важную роль данных цитокинов в патогенезе респираторных заболеваний [49–53].

Таким образом, полученные в нашей работе данные позволяют предположить, что попадание НЧ городской пыли в кровеносные сосуды дыха-

тельных путей и других органов может стимулировать в них воспалительные реакции нейтрофилов и макрофагов. Этот эффект может быть особенно ярко выражен в очагах воспаления, возникших до вдыхания пыли, в частности, при ХОБЛ и астме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-14-00084). Работа с нейтрофилами человека одобрена Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова (заявка №6-ч ред., заседание комиссии №131-д 31 мая 2021 г.), все доноры дали информированное согласие. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Giere R., Querol X. Solid particulate matter in the atmosphere. *Elements*. 2010;6(4):215–222.
2. Haynes H.M., Taylor K.G., Rothwell J., Byrne P. Characterisation of road-dust sediment in urban systems: a review of a global challenge. *J. Soils Sediments*. 2020;20(12):4194–4217.
3. Loomis D., Grosse Y., Lauby-Secretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., Baan R., Mattock H., Straif K. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol*. 2013;14(13):1262–1263.
4. Ревич Б.А. Мелкодисперсные взвешенные частицы в атмосферном воздухе и их воздействие на здоровье жителей мегаполисов. *Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем*. 2018;29(3):53–78.
5. Hu X., Zhang Y., Luo J., Wang T., Lian H., Ding Z. Bioaccessibility and health risk of arsenic, mercury and other metals in urban street dusts from a mega-city, Nanjing, China. *Environ. Pollut*. 2011;159(5):1215–1221.
6. Albanese A., Tang P.S., Chan W.C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2012;14(1):1–16.
7. Saffari A., Daher N., Shafer M.M., Schauer J.J., Sioutas C. Seasonal and spatial variation of trace elements and metals in quasi-ultrafine (PM_{0.25}) particles in the Los Angeles metropolitan area and characterization of their sources. *Environ. Pollut*. 2013;181:14–23.
8. Deng J., Zhang Y., Qiu Y., Zhang H., Du W., Xu L., Hong Y., Chen Y., Chen J. Source apportionment of PM_{2.5} at the Lin'an regional background site in China with three receptor models. *Atmos. Res*. 2018;202:23–32.
9. Dietrich M., O'Shea M.J., Gieré R., Krekeler M.P.S. Road sediment, an underutilized material in environmental science research: a review of perspectives on United States studies with international context. *J. Hazard. Mater*. 2022;432:128604.
10. Phairuang W., Inerb M., Hata M., Furuuchi M. Characteristics of trace elements bound to ambient nanoparticles (PM_{0.1}) and a health risk assessment in southern Thailand. *J. Hazard Mater*. 2022;425:127986.
11. Fedotov P.S., Ermolin M.S., Karandashev V.K., Ladonin D.V. Characterization of size, morphology and elemental composition of nano-, submicron, and micron particles of street dust separated using field-flow fractionation in a rotating coiled column. *Talanta*. 2014;130:1–7.
12. Ermolin M.S., Fedotov P.S., Ivaneev A.I., Karandashev V.K., Fedyunina N.N., Burmistrov A.A. A contribution of nanoscale particles of road-deposited sediments to the pollution of urban runoff by heavy metals. *Chemosphere*. 2018;210:65–75.
13. Gualtieri M., Øvrevik J., Holme J.A., Perrone M.G., Bolzacchini E., Schwarze P.E., Camatini M. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol. In Vitro*. 2010;24(1):29–39.
14. Babin K., Antoine F., Goncalves D.M., Girard D. TiO₂, CeO₂ and ZnO nanoparticles and modulation of the degranulation process in human neutrophils. *Toxicol. Lett*. 2013;221(1):57–63.
15. Masoud R., Bizouarn T., Trepout S., Wien F., Baciou L., Marco S., Houée Levin C. Titanium dioxide nanoparticles increase superoxide anion production by acting on NADPH oxidase. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144829.
16. Poulsen K.M., Albright M.C., Niemuth N.J., Tighe R.M., Payne C.K. Interaction of TiO₂ nanoparticles with lung fluid proteins and the resulting macrophage inflammatory response. *Environ. Sci. Nano*. 2023;10(9):2427–2436.
17. Pavlin M., Lojk J., Strojani K., Hafner-Bratkovič I., Jerala R., Leonardi A., Križaj I., Drnovšek N., Novak S., Veranič P., Bregar V.B. The relevance of physico-chemical properties and protein corona for evaluation of nanoparticles immunotoxicity-in vitro correlation analysis on THP-1 macrophages. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(11):6197.
18. Svadlakova T., Holmannova D., Kolackova M., Malkova A., Krejsek J., Fiala Z. Immunotoxicity of carbon-based nanomaterials, starring phagocytes. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(16):8889.
19. Glencross D.A., Ho T-R., Camiña N., Hawrylowicz C.M., Pfeffer P.E. Air pollution and its effects on the immune system. *Free Radic. Biol. Med*. 2020;151:56–68.
20. Vorobjeva N.V., Chernyak B.V. NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(10):1178–1190.
21. Mass E., Nimmerjahn F., Kierdorf K., Schlitzer A. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat. Rev. Immunol*. 2023;23(9):563–579.
22. Sheu K.M., Hoffmann A. Functional hallmarks of healthy macrophage responses: their regulatory basis and disease relevance. *Annu. Rev. Immunol*. 2022;40(1):295–321.
23. Ivaneev A.I., Brzhezinskiy A.S., Karandashev V.K., Ermolin M.S., Fedotov P.S. Assessment of sources, environmental, ecological, and health risks of potentially toxic elements in urban dust of Moscow megacity, Russia. *Chemosphere*. 2023;321:138142.

24. Ivaneev A.I., Ermolin M.S., Fedotov P.S., Faucher S., Lespes G. Sedimentation field-flow fractionation in thin channels and rotating columns: from analytical to preparative scale separations. *Sep. Purif. Rev.* 2020;50(4):363–379.
25. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 2017;96(3):254–265.
26. Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshchev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B. Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020;1866(5):165664.
27. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 2014;23(1):37–45.
28. Mohd Yasin Z.N., Mohd Idrus F.N., Hoe C.H., Yvonne-Tee G.B. Macrophage polarization in THP-1 cell line and primary monocytes: a systematic review. *Differentiation.* 2022;128:67–82.
29. Kettler K., Giannakou C., de Jong W.H., Hendriks A.J., Krystek P. Uptake of silver nanoparticles by monocytic THP-1 cells depends on particle size and presence of serum proteins. *J. Nanopart. Res.* 2016;18(9):286.
30. Premshkharan G., Nguyen K., Zhang H., Forman H.J., Leppert V.J. Low dose inflammatory potential of silica particles in human-derived THP-1 macrophage cell culture studies – mechanism and effects of particle size and iron. *Chem. Biol. Interact.* 2017;272:160–171.
31. Brzicova T., Javorkova E., Vrbova K., Zajicova A., Holan V., Pinkas D., Philimonenko V., Sikorova J., Klema J., Topinka J., Rossner P. Jr. Molecular responses in THP-1 macrophage-like cells exposed to diverse nanoparticles. *Nanomaterials.* 2019;9(5):687.
32. Zijno A., Cavallo D., Di Felice G., Ponti J., Barletta B., Butteroni C., Corinti S., De Berardis B., Palamides J., Ursini C.L., Freseghna A.M., Ciervo A., Maiello R., Barone F. Use of a common European approach for nanomaterials' testing to support regulation: a case study on titanium and silicon dioxide representative nanomaterials. *J. Appl. Toxicol.* 2020;40(11):1511–1525.
33. Smulders S., Kaiser J.-P., Zuin S., Van Landuyt K.L., Golanski L., Vanoirbeek J., Wick P., Hoet P.H. Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Part. Fibre Toxicol.* 2012;9:41.
34. Bhor V.M., Thomas C.J., Surolia N., Surolia A. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol. Biosyst.* 2005;1(3):213–222.
35. Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* 2012;7(12):779–786.
36. Neagu M., Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Docea A.O., Constantin C., Negrei C., Nikitovic D., Tsatsakis A. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. *Arch. Toxicol.* 2017;91(3):1031–1048.
37. Cai K., Wang A.Z., Yin L., Cheng J. Bio-nano interface: The impact of biological environment on nanomaterials and their delivery properties. *J. Control Release.* 2017;263:211–222.
38. Bianchi M.G., Allegri M., Chiu M., Costa A.L., Blosi M., Ortelli S., Bussolati O., Bergamaschi E. Lipopolysaccharide adsorbed to the bio-corona of TiO₂ nanoparticles powerfully activates selected pro-inflammatory transduction pathways. *Front. Immunol.* 2017;8:866.
39. Li Y., Shi Z., Radauer-Preiml I., Andosch A., Casals E., Luetz-Meindl U., Cobaleda M., Lin Z., Jaber-Douraki M., Italiani P., Horejs-Hoeck J., Himly M., Monteiro-Riviere N.A., Duschl A., Puentes V.F., Boraschi D. Bacterial endotoxin (lipopolysaccharide) binds to the surface of gold nanoparticles, interferes with biocorona formation and induces human monocyte inflammatory activation. *Nanotoxicology.* 2017;11(9–10):1157–1175.
40. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503–3521.
41. Guthrie L.A., McPhail L.C., Henson P.M., Johnston R.B. Jr. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J. Exp. Med.* 1984;160(6):1656–1671.
42. Goodridge H.S., Wolf A.J., Underhill D.M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* 2009;230(1):38–50.
43. Forehand J.R., Pabst M.J., Phillips W.A., Johnston R.B. Jr. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest.* 1989;83(1):74–83.
44. Böhmer R.H., Trinkle L.S., Staneck J.L. Dose effects of LPS on neutrophils in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. *Cytometry.* 1992;13(5):525–531.
45. Wan J., Shan Y., Fan Y., Fan C., Chen S., Sun J., Zhu L., Qin L., Yu M., Lin Z. NF- κ B inhibition attenuates LPS-induced TLR4 activation in monocyte cells. *Mol. Med. Rep.* 2016;14(5):4505–4510.
46. Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell.* 2002;10(2):417–426.
47. Kagi T., Naganuma R., Inoue A., Noguchi T., Hamano S., Sekiguchi Y., Hwang G.W., Hirata Y., Matsuzawa A. The polypeptide antibiotic polymyxin B acts as a pro-inflammatory irritant by preferentially targeting macrophages. *J. Antibiot.* 2022;75(1):29–39.
48. Arango Duque G., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 2014;5:491.
49. Barnes P.J. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2009;41(6):631–638.
50. Matera M.G., Calzetta L., Cazzola M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2010;23(2):121–128.
51. Rincon M., Irvin C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(9):1281–1290.
52. Barnes P.J. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2018;18(7):454–466.
53. Osei E.T., Brandsma C.-A., Timens W., Heijink I.H., Hackett T.-L. Current perspectives on the role of interleukin-1 signalling in the pathogenesis of asthma and COPD. *Eur. Respir. J.* 2020;55(2):1900563.

Поступила в редакцию 15.07.2024

После доработки 26.09.2024

Принята в печать 02.10.2024

RESEARCH ARTICLE

Urban dust nanoparticles induce proinflammatory activation of neutrophils and macrophages

A.N. Pavlyuchenkova^{1, 2, 3} , N.V. Vorobyeva⁴ , A.A. Dashkevich^{1, 2} ,
L.A. Zinovkina^{1, 2} , A.I. Ivanev⁵ , M.S. Ermolin⁵ , P.S. Fedotov^{1, 5} ,
R.A. Zinovkin¹ , M.A. Chelombitko¹ , B.V. Chernyak^{1, *} 

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

²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–73, Moscow, 119234, Russia;

³Evolutionary Cytogerontology Sector and ⁴Department of Immunology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

⁵Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Kosygina 19, Moscow, 119334, Russia

*e-mail: bchernyak1@gmail.com

Urban dust particles are a major pathogenic factor in respiratory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease, and also increase the risk of cardiovascular disease and lung cancer. Nanoparticles (NPs) of various origins are an important component of urban dust, but their effects on the human body are barely studied. In the present work, the effect of urban dust NPs on innate immune cells, neutrophils and macrophages was investigated *in vitro*. Urban dust nanoparticles were isolated from urban dust samples using coiled tube field-flow fractionation technique. Urban dust NPs were shown to induce a slight increase in the production of reactive oxygen species in human neutrophils. Preincubation of neutrophils with dust NPs resulted in a significant increase in ROS production in response to the chemoattractant peptide *N*-formylmethionine-leucyl-phenylalanine (fMLP). This suggests an effect of neutrophil priming with nanoparticles. On macrophages differentiated from the monocytic line THP-1, urban dust NPs stimulated the secretion of pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor, and interleukin-6. The inflammatory activation of neutrophils and macrophages was reduced by antibiotic polymyxin B, which is able to bind bacterial wall lipopolysaccharide. The results suggest that the pro-inflammatory effect of urban dust NPs on neutrophils and macrophages is, at least in part, due to the presence of LPS.

Keywords: nanoparticles, urban dust, innate immune cells, inflammatory activation, neutrophils, macrophages

Funding: The research was funded by the Russian Science Foundation (project No. 23-14-00084).

Сведения об авторах

Павлюченкова Анастасия Никитична — аспирантка факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, вед. инженер отд. биоэнергетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, инженер 1 категории сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: anabella.gen@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3694-8007>

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

Дашкевич Анна Алексеевна — студентка факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, инженер 1 категории отд. биоэнергетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: anna.dash.221@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6728-9849>

Зиновкина Людмила Андреевна — канд. биол. наук, доц. факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ, ст. науч. сотр. отд. биоэнергетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: luzinovkina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2583-6448>

Иванеев Александр Игоревич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН. Тел.: 8-495-939-70-01; e-mail: aiivaneev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6356-5784>

Ермолин Михаил Сергеевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН. Тел.: 8-495-939-70-01; e-mail: ermolin@geokhi.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0023-4507>

Федотов Петр Сергеевич — докт. хим. наук, гл. науч. сотр., зав. лаб. геохимии наночастиц Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН. Тел.: 8-495-939-70-01; e-mail: fedotov_ps@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0246-9905>

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>

Челомбитко Мария Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. биоэнергетики 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>

Черняк Борис Викторович — докт. биол. наук, зав. лаб. биоэнергетики клетки НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-50-30; e-mail: bchernyak1@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1523-0864>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 578.2+578.53

Секвенирование и анализ полного генома российского изолята вируса А черешни (cherry virus A)**Е.В. Моцарь¹, А.А. Шевелева¹, Ф.С. Шарко² , И.В. Митрофанова³ , С.Н. Чирков^{1,*}** ¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия, 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1;³Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина, Российская академия наук, Россия, 127276, г. Москва, Ботаническая ул., д. 4

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Вирусные болезни косточковых плодовых культур (*Prunus* spp.) снижают урожай, ухудшают качество плодов и укорачивают продуктивную жизнь деревьев. Из более чем пятидесяти известных вирусов, поражающих этих культуры, вирус черешни А (cherry virus A, CVA, род *Capillovirus* в семействе *Betaflexiviridae*) является одним из самых распространенных. При обследовании коллекции косточковых Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН (г. Москва) было обнаружено дерево черешни (*P. avium*) сорта Ипуть с вирусоподобными симптомами морщинистости на листьях. При изучении вирома этого растения с помощью высокопроизводительного секвенирования получены прочтения, родственные CVA, и собран полный геном нового изолята этого вируса, названного SwC14. Типичным для капилловирусов образом, геном SwC14 содержал две открытые рамки считывания, кодирующих вирусную репликазу, белок оболочки и транспортный белок. Последовательность генома SwC14 наиболее близка ряду канадских изолятов CVA из черешни (идентичность 99,4%) и на 81,4–95,0% идентична изолятам этого вируса из других видов косточковых и других регионов мира, включая охарактеризованный ранее крымский изолят РТС (идентичность 82,0%). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией CVA был также выявлен в шести из семи других обследованных бессимптомных сортов черешни. Это первое сообщение о находке дивергентных изолятов CVA в Центральной России, что расширяет информацию о географическом распространении и генетическом разнообразии вируса.

Ключевые слова: косточковые культуры, генофондовые коллекции, фитовирусы, вирус А черешни, высокопроизводительное секвенирование, филогенетический анализ

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-6

Введение

Косточковые плодовые культуры (*Prunus* spp., семейство *Rosaceae*) возделываются по всему миру и имеют важное экономическое значение [1]. Вирусные болезни снижают урожай, ухудшают качество плодов и укорачивают продуктивную жизнь деревьев. Известно более пятидесяти вирусов, способных заражать косточковые. В последние годы этот список быстро расширяется ввиду активного изучения вирома плодовых деревьев с помощью высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing, HTS) [2–4].

В России осуществляется регулярный мониторинг вирусных болезней косточковых культур, охватывающий промышленные и дачные сады,

питомники, сортовые и генофондовые коллекции, дикорастущие косточковые [5]. Основными объектами фитосанитарного мониторинга являются вирус оспы сливы и иларвирусы некротической кольцевой пятнистости и карликовости слив как самые вредоносные и наиболее распространенные. Вместе с тем, распространенность большинства других известных вирусов косточковых культур – например, вируса А черешни (cherry virus A, CVA) – остается практически не изученной.

CVA является представителем рода *Capillovirus* из семейства *Betaflexiviridae*. Геном состоит из одонитевой полиаденилированной РНК положительной полярности размером около 7,5 тыс. п.н., в которой идентифицированы две открытые рамки

считывания (open reading frame, ORF). ORF1 кодирует полипротеин, содержащий белки репликации и белок оболочки (coat protein, CP) вируса. ORF1 фланкирована 5'- и 3'-некодирующими участками генома (untranslated regions, UTR). ORF2 находится полностью внутри ORF1 и транслируется в другой рамке считывания с образованием транспортного белка (movement protein, MP) [6].

CVA был впервые найден на черешне (*P. avium*) в Германии [6]. В настоящее время он является одним из самых распространенных вирусов этой культуры и обнаружен также на вишне (*P. cerasus*), персике (*P. persica*), абрикосе (*P. armeniaca*), сливе (*P. domestica*), алыче (*P. cerasifera*), японской (китайской) сливе (*P. salicina*), вишне мелкопильчатой (*P. serrulata*) и абрикосе японском (*P. mume*) [7]. CVA передается от растения к растению при вегетативном размножении, главным образом через прививки [8]. На вишне и черешне инфекция CVA обычно протекает латентно, и ни одно заболевание этих культур не может быть достоверно ассоциировано с данным вирусом. Однако CVA может модулировать симптомы, индуцируемые другими вирусами, и влиять на совместимость привоя и подвоя [9, 10]. CVA распространен повсюду, где возделывают черешню. Единственный до последнего времени российский изолят РТС этого вируса был обнаружен на межвидовом гибриде абрикоса и алычи в коллекции косточковых культур Никитского ботанического сада в Крыму [11].

Еще один изолят CVA недавно обнаружен на черешне в Главном ботаническом саду имени Н.В. Цицина РАН (ГБС) в Москве. Целями данной работы были секвенирование, сборка и характеристика полного генома московского изолята CVA, а также его сравнение с известными изолятами данного вируса, доступными в GenBank.

Материалы и методы

Листья черешни сорта Ипуть с вирусоподобными симптомами морщинистости, а также семи других деревьев черешни различных сортов без внешних признаков болезни собирали в коллекции косточковых лаборатории культурных растений ГБС в августе 2022 г. Все деревья черешни были в возрасте от 4 до 5 лет и привиты на антипку (*P. mahaleb*). Образцы доставляли на кафедру вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и хранили при температуре 4°C до дальнейшей обработки.

Общую РНК выделяли из свежих листьев с помощью цетилтриметиламмония бромида (cetriltrimethylammonium bromide, СТАВ) [12]. Библиотеку кДНК синтезировали на матрице общей РНК из черешни Ипуть с помощью набора TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Plant kit (Illumina, San Diego, США) и секвенировали на платформе Illumina MiSeq в Национальном исследовательском центре «Курчатовский Институт». Получен-

ные парноконцевые прочтения длиной 150 нуклеотидов (нт) обрезали и фильтровали по качеству с помощью FastQC v.0.11.9 и Trim Galore v.0.6.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore, дата обращения 19 сентября 2023 г.), используя настройки по умолчанию. Контиги собирали *de novo* с помощью программы metaSPAdes версии 3.15 [13]. Вирусные контиги идентифицировали путем выравнивания всех собранных контигов на нуклеотидную коллекцию NCBI GenBank с помощью BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, дата обращения 21 декабря 2023 г.) с пороговым значением $E = 1e-05$. Отфильтрованные прочтения картировали на контиги CVA с помощью программы Bowtie2 v.2.4.4 [14].

Общую РНК использовали также в качестве матрицы для выявления CVA в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Первую нить кДНК синтезировали с помощью затравки из случайных гексамерных праймеров и обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (Moloney murine leukemia virus, MMLV) (оба реагента производства Евроген, Москва). В ПЦР использовали Taq ДНК-полимеразу (Евроген) и праймеры CVA-F1 (5'-AGAATCAGGCTCTGTCTTAGGT-3') и CVA-R1 (5'-TCTAGCTCTTGTGAGCGTGGT-3'), которые были разработаны на основе полной последовательности генома крымского изолята РТС (OQ865368) [11]. Эти праймеры амплифицировали 5'-концевой сегмент гена MP с образованием ампликона размером 837 п.н. в следующих условиях: денатурация 94°C – 3 мин, 35 циклов ПЦР (денатурация 94°C – 30 с, отжиг 54°C – 30 с, элонгация 72°C – 1 мин) и окончательная достройка при 72°C в течение 10 мин. Общая РНК из черешни, не зараженной CVA, служила отрицательным контролем. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и фотографировали с помощью гель-документирующего устройства MultiDoc-It (Analytik Jena US LLC, Upland, США).

Для анализа нового генома CVA были использованы геномные последовательности других изолятов этого вируса, доступные в GenBank. Множественное выравнивание, определение степени идентичности и филогенетический анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы MEGA X [15]. Филогенетическое дерево реконструировали с использованием метода максимального правдоподобия и модели General Time Reversible. Рамки считывания в полном вирусном геноме идентифицировали с помощью программы ORF finder (<https://ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>, дата обращения 29 мая 2024 г.). Консервативные домены вирусных белков картировали с помощью базы данных Conserved Domain Database (CDD, <https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, дата обращения 29 мая 2024 г.).

Результаты и обсуждение

При обследовании насаждений косточковых плодовых культур ГЭС обнаружено дерево черешни сорта Ипать с симптомами морщинистости и стягивания центральной жилки листовой пластинки (рис. 1). При анализе виroma этого растения с помощью HTS было получено около 10 млн (9999801) прочтений длиной 150 п.н., из которых 8676 (0,09%) картировались на геном CVA с глубиной покрытия от 400× до 720×. Собранный из вирусных прочтений контиг длиной 7401 нт оказался наиболее близок (99,3–99,4% идентичности) геномам канадских изолятов CVA 13TF120_N8 (KY510908), 13TF101_N33 (KY510892) и 19SP016 (MZ291924) из черешни, а также изоляту Rannanja 46 (KU215411) из вишни (при 100%-ном покрытии референсных геномов) и, таким образом, представлял собой почти полный геном российского изолята этого вируса. При ОТ-ПЦР на матрице общей РНК из восьми сортов черешни с использованием CVA-специфичных праймеров в сорте Ипать был получен ампликон ожидаемого размера 837 п.н., что подтверждало присутствие CVA в исследуемом образце (рис. 2). Секвенирование продукта ПЦР показало его полную идентичность соответствующей последовательности генома CVA, определенной с помощью HTS. Обнаруженный в ГЭС изолят CVA получил название SwC14. Частичная и полная последовательности генома SwC14 были депонированы в GenBank под номерами OQ921584 и PQ036874 соответственно.

Типичным для рода *Capillovirus* образом, две ORF были предсказаны в геноме SwC14. ORF1 длиной 7029 нт кодирует полипротеин из 2342 аминокислотных (amino acid, aa) остатков, а ORF2 длиной 1392 нт (нуклеотиды 5440–6831) находится в другой рамке считывания и кодирует МР из 463 aa. В полипротеине были обнаружены мотивы вирусной метилтрансферазы (позиции 43–351), РНК-хеликазы (818–1096), РНК-зависимой РНК-полимеразы (1283–1600) и белка оболочки триховирусов (Tricho_coat superfamily, позиции 2178–2335). Вирусный домен неизвестной функции (DUF1717) обнаружен в N-концевом участке полипротеина (позиции 1–78). 5'- и 3'-UTR (за исключением поли-А-последовательности) состояли из 94 и 278 нт соответственно.

Филогенетический анализ всех доступных полноразмерных геномов CVA (n = 127, дата обращения 1 июня 2024 г.) показал, что вирусные изоляты, в полном соответствии с предыдущими данными [7, 16, 17], объединены в несколько групп (рис. 3). SwC14 входил в кластер, образованный 17 изолятами CVA, найденными главным образом на черешне в Канаде [7], а также в Чехии и Индии [18]. Один изолят (KU215411) был выявлен в Чехии на вишне. Входящие в этот кластер изоляты имели длину генома от 7344 до 7440 нт и были

идентичны SwC14 на 98,9–99,4%. С полными геномами CVA из других филогенетических групп SwC14 идентичен на 81,4–95,0%. В частности, SwC14 оказался на 82% идентичен изоляту РТС, обнаруженному ранее в Крыму на межвидовом гибриде абрикоса и алычи [11]. При этом ORF1 и ORF2 обоих изолятов CVA были одинаковой длины и кодировали белки одинакового размера. По-видимому, изоляты РТС и SwC14 были независимо завезены в Россию с зараженным материалом из разных источников.



Рис. 1. Морщинистость на листьях черешни (*Prunus avium*), зараженной вирусом А черешни.

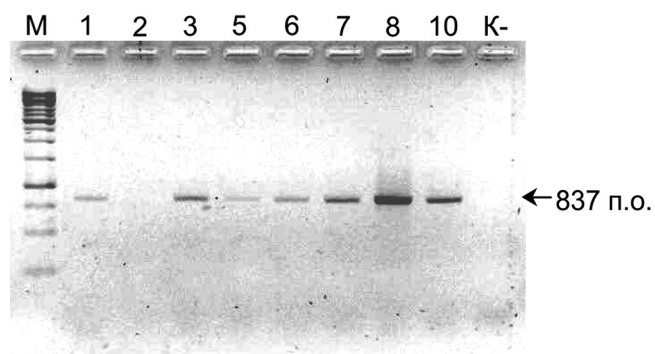


Рис. 2. Электрофорез в геле агарозы продуктов ПЦР, полученных при анализе образцов черешни сортов Юлия (1), Черемшанная (2), Ипать (3), Ревна (5), Тютчевка (6), Орловская Янтарная (7), Витязь (8), Бряночка (10). К – отрицательный контроль из черешни, не зараженной CVA. М – GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Стрелка справа от рисунка указывает на продукт ПЦР размером 837 пар оснований.

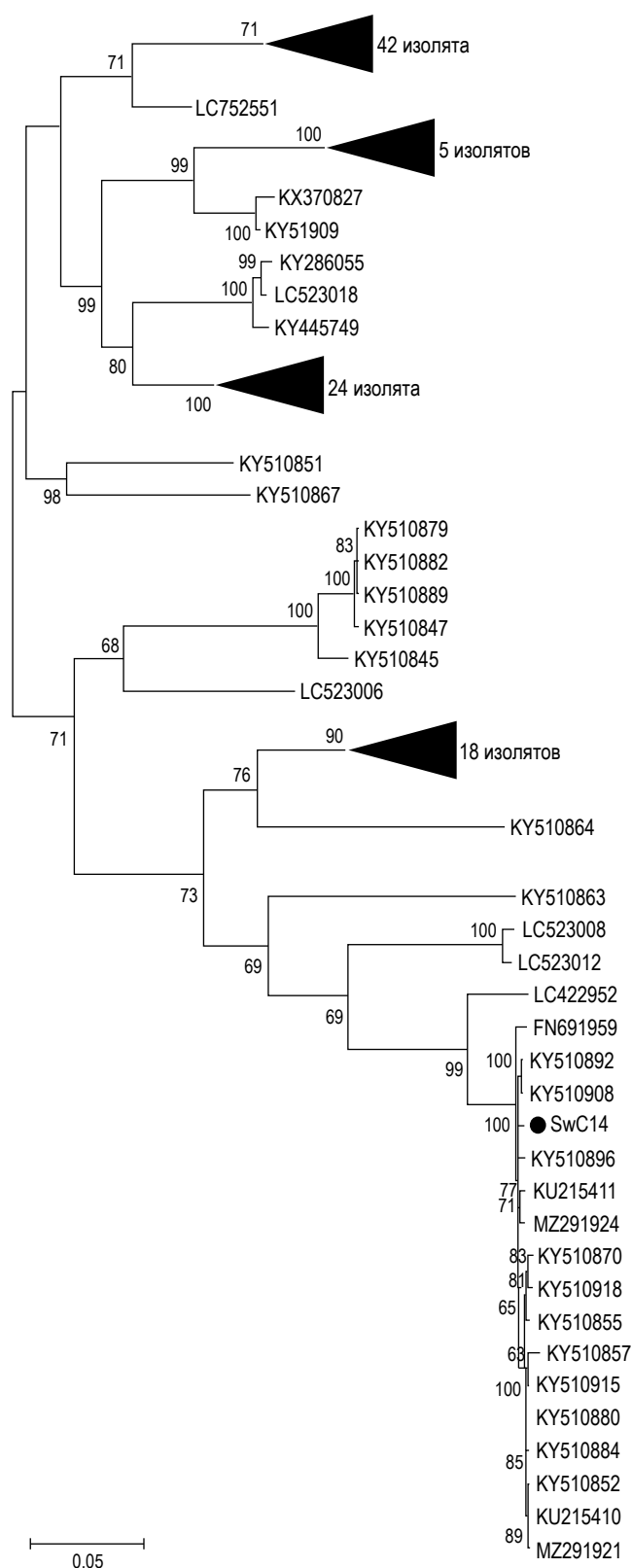


Рис. 3. Филогенетический анализ полных геномов вируса А черешни (CVA). Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с модели использованием General Time Reversible в программе MEGA X [15]. Номера последовательностей CVA в GenBank указаны на концах ветвей. Знаком (•) отмечен изолят SwC14, изученный в данной работе. Черными треугольниками обозначены конденсированные кластеры. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>60%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта означает количество замен на 1 нуклеотид.

CVA распространяется в насаждениях черешни в основном при прививках зараженного материала [8]. Поскольку изученные в данной работе деревья черешни были привитые, их зараженность этим вирусом была изучена с помощью ОТ-ПЦР, несмотря на отсутствие видимых симптомов. Помимо сорта Ипуть, CVA был обнаружен в шести из семи других обследованных сортов (рис. 2), что указывает на широкое распространение этого вируса в насаждениях черешни в ГБС. Секвенирование продуктов ПЦР показало, что изоляты CVA из сортов Юлия, Ревна, Тютчевка, Орловская Янтарная и Бряночка на 99,1–99,6% идентичны соответствующему участку генома SwC14 из сорта Ипуть и, видимо, имеют с этим изолятом общего предка. В то же время, изолят из сорта Витязь оказался идентичен SwC14 только на 87,7% и близкородственен австралийским изолятам CVA LV35S1 (LC523012) и TAS12S2 (LC523008) из черешни [19] (идентичность 99,3–99,7%). Частичные последовательности MP CVA были депонированы в GenBank под номерами PQ117754–PQ117758. Принимая во внимание тесное родство изолятов CVA из нескольких сортов черешни, можно предположить, что вирус был привнесен в насаждения с зараженным подвоем (антипкой). Однако у сорта Витязь заражен был, по-видимому, подвой. Очевидно, путь интродукции CVA включал в себя инфицирование и привоев, и подвоев. Обнаружение новых изолятов CVA в г. Москве расширяет информацию о географическом распространении и генетическом разнообразии вируса.

Инфекция CVA на черешне обычно бессимптомна [8]. Однако на листьях черешни сорта Ипуть, зараженной изолятом SwC14, была обнаружена сильная морщинистость, обусловленная стягиванием центральной жилки листа. Наблюдаемые симптомы могли быть вызваны другими вирусами. Заражение одного и того же дерева несколькими вирусами из различных таксономических групп часто наблюдается на черешне [20]. Однако изучение виroma этого дерева не выявило прочтений, родственным каким-либо другим вирусам, помимо CVA (данные не представлены). Остальные зараженные CVA деревья черешни были бессимптомны. Таким образом, причины морщинистости еще предстоит определить. Возможно, она не связана с вирусной инфекцией, а, например, является результатом питания тлей на молодых листьях, которые затем возобновили рост.

Следует отметить, что праймеры CVA-F1/CVA-R1 были разработаны для диагностики нечерешневых изолятов вируса [11]. В данной работе они распознавали также ряд дивергентных черешневых изолятов (рис. 2). Известно, что в силу высокого генетического разнообразия CVA (идентичность между полногеномными последовательностями составляет 79,0–99,9% [7]), уни-

версальные праймеры для надежного выявления любых изолятов вируса в ОТ-ПЦР пока не разработаны [7, 10, 20]. В этой связи использование праймеров CVA-F1/CVA-R1 может иметь большое практическое значение для успешного выявления новых изолятов CVA в различных косточковых культурах.

Таким образом, в насаждениях косточковых культур ГЭС выявлен CVA и секвенирован полный геном одного из изолятов. Обнаружение дивергентных изолятов в географически отдаленных областях России (Крым и Москве) указывает на возможность существования генетиче-

ски разнообразной популяции этого вируса на различных косточковых культурах в Европейской части России.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-16-00032). Авторы выражают глубокую благодарность В.А. Крючковой за помощь при обследовании коллекции косточковых ГЭС. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hadidi A., Barba M. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. Eds. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse, W. Jelkmann W. St. Paul: APS Press; 2011. 428 pp.
2. Maliogka V., Minafra A., Saldarelli P., Ruiz-García A., Glasa M., Katis N., Olmos A. Recent advances on detection and characterization of fruit tree viruses using high-throughput sequencing technologies. *Viruses*. 2018;10(8):436.
3. Rubio M., Martinez-Gomez P., Marais A., Sanchez-Navarro J.A., Pallas V., Candresse T. Recent advances and prospect in *Prunus* virology. *Ann. Appl. Biol.* 2017;171(2):125–138.
4. Rott M., Xiang Y., Boyes I., Belton M., Saeed H., Kesanakurti P., Hayes S., Lawrence T., Birch C., Bhagwat B., Rast H. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Dis.* 2017;101(8):1489–1499.
5. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Кондратьев М.О. Видовой состав и распространенность вирусов в насаждениях косточковых культур Европейской части Российской Федерации. *Бюл. ГНБС*. 2024;150:63–68.
6. Jelkmann W. Cherry virus A: cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *J. Gen. Virol.* 1995;76(8):2015–2024.
7. Kesanakurti P., Belton M., Saeed H., Rast H., Boyes I., Rott M. Comparative analysis of cherry virus A genome sequences assembled from deep sequencing data. *Arch. Virol.* 2017;162(9):2821–2828.
8. Marais A., Candresse T., Svanella-Dumas L., Jelkmann W. Cherry virus A. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. Eds. A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse and W. Jelkmann. St. Paul: APS Press; 2011. 428 pp.
9. James D., Jelkmann W. Detection of cherry virus A in Canada and Germany. *Acta Hort.* 1998;472:299–303.
10. Marais A., Svanella-Dumas L., Barone M., Gentit P., Faure C., Charlot G., Ragozzino A., Candresse T. Development of a polyvalent RT-PCR assay covering the genetic diversity of *Cherry capillovirus A*. *Plant Pathol.* 2012;61(1):195–204.
11. Chirkov S., Sheveleva A., Tsygankova S., Slobodova N., Sharko F., Petrova K., Mitrofanova I. First report and complete genome characterization of cherry virus A and little cherry virus 1 from Russia. *Plants*. 2023;12(18):3295.
12. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem. Anal.* 2008;19(6):520–525.
13. Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 2017;27(5):824–834.
14. Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*. 2012;9(4):357–359.
15. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018;35(6):1547–1549.
16. Noorani M.S., Khan A.J., Khursheed S. Molecular characterization of cherry virus A and prunus necrotic ringspot virus and their variability based on nucleotide polymorphism. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 2022;55(4):387–404.
17. Gao R., Xu Y., Candresse T., He Z., Li S., Ma Y., Lu M. Further insight into genetic variation and haplotype diversity of *Cherry virus A* from China. *PloS One*. 2017;12(10):e0186273.
18. Noorani M.S., Awasthi P., Singh R.M., Ram R., Sharma M.P., Singh S.R., Ahmed N., Hallan V., Zaid A.A. Complete nucleotide sequence of cherry virus A (CVA) infecting sweet cherry in India. *Arch. Virol.* 2010;155(12):2079–2082.
19. Kinoti W.M., Nancarrow N., Dann A., Rodoni B.C., Constable F.E. Updating the quarantine status of *Prunus* infecting viruses in Australia. *Viruses*. 2020;12(2):246.
20. Cao X., Tian L., Yuan X., Andika I.B. Development of a multiplex RT-PCR and the occurrence characteristics of viral diseases in sweet cherries in the Shandong province, China. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2022;121:101881.

Поступила в редакцию 05.08.2024

После доработки 02.11.2024

Принята в печать 06.11.2024

RESEARCH ARTICLE

Sequencing and analysis of the complete genome of the Russian cherry virus A isolate

E.V. Motsar¹, A.A. Sheveleva¹, F.S. Sharke² , I.V. Mitrofanova³ , S.N. Chirkov^{1, *} 

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

²National Research Center “Kurchatov Institute,” Academician Kurchatov Square 1, Moscow, 123182, Russia;

³Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya st. 4, 127276, Moscow, Russia

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Virus diseases of stone fruit crops (*Prunus* spp.) reduce both fruit yield and quality and shorten the productive life of fruit trees. Of the more than fifty known viruses affecting these crops, cherry virus A (CVA, genus *Capillovirus*, family Betaflexiviridae) is one of the most common. During a survey of stone fruit collections of the Tsitsin Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences (Moscow), a sweet cherry (*P. avium*) tree of the cultivar Iput with virus-like rugosity symptoms on the leaves was found. When studying the virome of this plant using high-throughput sequencing, reads related to CVA were obtained and the complete genome of a new isolate of this virus, named SwC14, was assembled. Typically of capilloviruses, the SwC14 genome contained two open reading frames encoding a viral replicase, a coat protein and a movement protein. The SwC14 genome sequence was shown to be closest to the genomes of some Canadian sweet cherry CVA isolates (99.4% identity) and 81.4–95.0% identical to isolates of this virus from other stone fruit species and other regions of the world, including the previously characterized Crimean isolate PTC (82.0% identity). CVA was also detected in six of the seven other symptomless cherry cultivars examined by RT-PCR. This is the first report of a divergent CVA isolate in Central Russia, which expands information on the geographical distribution and genetic diversity of the virus.

Keywords: stone fruit crops, germplasm collections, plant viruses, cherry virus A, high-throughput sequencing, phylogenetic analysis

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-16-00032.

Сведения об авторах

Моцарь Елена Валериевна — аспирант кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: elena.motsar31@gmail.com

Шевелева Анна Александровна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: annesh@yandex.ru

Шарко Федор Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории палеогеномики НИЦ «Курчатовский институт». Тел.: 8-499-196-71-00 доб. 7937; e-mail: fedosic@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1189-5597>

Митрофанова Ирина Вячеславовна — чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, зав. лабораторией физиологии и иммунитета растений, гл. науч. сотр. лаборатории защиты растений Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН. Тел.: 8-978-843-85-23; e-mail: irimitrofanova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4650-6942>

Чирков Сергей Николаевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: s-chirkov1@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1353-4373>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 579.22+579.24+661.66+504.054

Влияние производных графена на биопленкообразование *Candida maltosa*

Е.В. Пьянкова¹ , Ю.Г. Максимова^{1, 2, *} ¹Институт экологии и генетики микроорганизмов, Уральское отделение Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия, 614081, г. Пермь, Голева, д. 13;²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

*e-mail: yul_max@mail.ru

Производные графена (оксид и его восстановленная форма) – перспективные углеродные наноматериалы (УНМ), используемые в промышленности, электронике, медицине и биотехнологии. Целью настоящей работы стало изучение влияния оксида графена (ОГ) и его восстановленной формы (ВОГ) на формирование и разрушение биопленок *Candida maltosa* ВКПМ У-194, а также на метаболическую активность, содержание внутриклеточного АТФ и проницаемость цитоплазматической мембраны клеток биопленок. Установлено, что ОГ и ВОГ незначительно подавляют биопленкообразование дрожжей, причем снижение биомассы биопленки при росте в присутствии ОГ достоверно больше, чем при росте клеток с ВОГ. Разрушение зрелых 7-суточных биопленок дрожжей незначительно больше в присутствии УНМ, чем в контроле, и достоверно больше, чем 3-суточных биопленок под воздействием УНМ. При этом метаболическая активность клеток биопленок, оцененная по восстановлению соли тетразолия (реактив methyl thiazolyl tetrazolium), достоверно выше контроля у 3-суточных биопленок, выращенных на питательной среде с ВОГ, и у 7-суточных биопленок с ОГ и ВОГ. Содержание внутриклеточного АТФ в биопленках, выращенных в присутствии УНМ, превышало таковое в контроле, но было ниже после 4 ч влияния на зрелые биопленки, выращенные на питательной среде без УНМ. Наибольшее негативное влияние на цитоплазматическую мембрану клеток биопленок, которое выражалось в увеличении ее проницаемости, оказывал ОГ при 4 ч воздействии на 7-суточную биопленку. Установлено, что негативное влияние УНМ на биопленки *C. maltosa* ВКПМ У-194 более выражено при воздействии ОГ, чем ВОГ, и выше при воздействии на 7-суточные биопленки, чем на 3-суточные биопленки. Полного ингибирования биопленкообразования и полной эрадикации зрелых биопленок под воздействием УНМ не наблюдали.

Ключевые слова: дрожжи, биопленки, оксид графена, восстановленный оксид графена, метаболическая активность, АТФ

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-7

Введение

Углеродные наноматериалы (УНМ) широко используются в различных сферах деятельности человека: промышленности, электронике, медицине, биотехнологии [1–3]. К УНМ относятся графен и его производные: оксид графена (ОГ), восстановленный оксид графена (ВОГ), а также фуллерены и углеродные нанотрубки. Графен представляет собой двумерную аллотропную модификацию углерода одноатомной толщины. ОГ содержит кислородсодержащие функциональные группы (карбокисильные, гидроксильные, фенольные, карбонильные, арильные, эфирные и т.д.), он способен взаимодействовать с биомолекулами посредством электростатического притяжения, π - π стэкинга и водородных связей. ОГ восстанавливают химиче-

скими, электрохимическими, термическими способами, в результате чего значительно повышается его гидрофобность [4]. Большие объемы производства, быстрое увеличение потребления и расширение сфер применения графена неизбежно приведут к выбросам этого нового материала и его производных в окружающую среду. Следовательно, необходимо комплексное изучение воздействия этих УНМ на человека, клетки и живые организмы, в том числе на микроорганизмы.

В соответствии с современными представлениями, сложившимися в микробиологии, основной формой существования микроорганизмов являются полимикробные агрегаты, такие как пленки, маты и флочки. Биопленка – прикрепленное к поверхности мультивидовое сообщество,

погруженное в вырабатываемый им полимерный матрикс. Внеклеточный экзополисахаридный матрикс иммобилизует клетки биопленки, удерживая в непосредственной близости друг к другу, обеспечивает межклеточные взаимодействия и формирование синергических связей в микроконсорциуме. Влияние различных веществ, в том числе биоцидов, антибиотиков, антисептиков, УНМ на клетки микроорганизмов в составе биопленки существенно отличается от их воздействия на неадгезированные клетки. Внеклеточное полимерное вещество защищает организмы биопленки от высыхания, окислителей, заряженных биоцидов, некоторых антибиотиков и катионов металлов, ультрафиолетового излучения, простейших-хищников и иммунной защиты макроорганизма [5]. Наряду с антибиотиками и биоцидами наночастицы рассматриваются как антибиопленочные агенты. Они способны нарушать целостность биопленки, взаимодействуя с матриксом, влияя на бактериальную коммуникацию — чувство кворума — и непосредственно на микробные клетки. Для проникновения в матрицу биопленки важен размер наночастиц и химия их поверхности [6]. УНМ могут проявлять свою антибиопленочную активность посредством множества механизмов, среди которых прямое взаимодействие с микробной клеткой (адсорбция, образование активных форм кислорода, индукция внутриклеточных эффектов, взаимодействие с ДНК и/или белками) и ингибирование образования биопленки (влияние на выработку внеклеточного матрикса, межклеточную коммуникацию) [7, 8]. Две взаимоисключающие задачи, такие как борьба с нежелательными биопленками (болезнетворными, коррозионными, вызывающими обрастания оборудования, систем коммуникации и т.д.) и поддержание биотехнологически значимых биопленок в биокатализе, ферментации, биodeградации, микробных топливных элементах, биосенсорах, могут быть решены с применением наноматериалов, которые либо борются с биопленками, либо, наоборот, модифицируют поверхность для повышения эффективности биопленкообразования.

Антимикробное и антибиопленочное действие производных графена в настоящее время широко обсуждается [9, 10]. Накоплено значительное количество противоречивых результатов, как подтверждающих, так и опровергающих данную гипотезу. Недавние исследования показали, что антибактериальная активность графена и материалов на его основе проявляется после прямых физических и химических взаимодействий УНМ с бактериями. Графен и его производные вызывают летальную деградацию клеточных компонентов, главным образом белков, нуклеиновых кислот и липидов, приводят к повреждению мембран, прерывают фазу репликации, взаимодействуя с водородными группами РНК/ДНК бактерий [11].

В работе О. Ахаван с соавторами было показано, что граммотрицательные бактерии *Escherichia coli* более устойчивы к повреждению цитоплазматической мембраны, вызванному ОГ и вОГ, чем грамположительные *Staphylococcus aureus*, лишенные внешней мембраны [12]. Показано, что концентрация кислорода в производных графена изменяет его антимикробное действие. Также в ряде работ было показано, что восстановление ОГ делает этот материал более эффективным по отношению к бактериям, чем его невосстановленный аналог. За счет большей гидрофобности он взаимодействует с липидным слоем мембраны и приводит к его деструкции [12, 13]. Было показано, что ОГ значительно усиливает рост, образование и развитие биопленок *E. coli* и *S. aureus* даже в концентрации 500 мг/л, тогда как вОГ (≥ 50 мг/л) проявлял сильный ингибирующий эффект по отношению к суспендированным клеткам и биопленкам, при этом ингибирующее действие вОГ (50 и 100 мг/л) ослаблялось к 24 ч (фаза зрелой биопленки) и устранялось через 48 ч [14]. Наоборот, в работе С.И. Саид с соавторами установлена антимикробная активность 200 мг/л ОГ в отношении *S. aureus*: жизнеспособность бактериальных клеток снижалась на 90%, при этом антимикробное действие ОГ сильно зависело от концентрации и времени воздействия. Также ОГ продемонстрировал антибиопленочную активность: при воздействии 100 мг/л масса биопленок снижалась на 30–70% [15]. Предполагается, что графен и его производные обладают большим потенциалом для использования в очистке сточных вод, в том числе и за счет своих антибактериальных и антибиопленочных свойств [16]. Однако низкие дозы ОГ, не обладающие бактериостатическим эффектом, могут способствовать пролиферации бактерий и приводят к увеличению их популяций в водной среде [17]. Также было показано, что при низких температурах ОГ усиливает анаболизм сообщества за счет стимуляции потребления органического углерода и регулирования экспрессии генов ферментов цикла Кребса и Энтнера-Дудорова, тем самым, возможно, стимулируя синтез и секрецию внеклеточных полимерных веществ [18].

Результаты научных исследований взаимодействия УНМ с микроорганизмами в основном касаются бактерий, вызывающих инфекционные заболевания. Воздействие производных графена на дрожжи изучено гораздо меньше. Дрожжи — это универсальный микроорганизм, имеющий важное значение для промышленности и биотехнологии, молекулярно-генетических исследований и изучения фундаментальных клеточных процессов [19]. В недавних работах был показан антифунгальный и антибиопленочный эффект ОГ [20, 21]. Графеновое нанопокрывало обладало антиадгезионными свойствами против *C. albicans*, которые выражались в значительном снижении количества жизне-

способных клеток, уровня метаболизма и биомассы биопленки по сравнению с контролем [20].

Дрожжи *C. maltosa* — модельный организм для изучения адаптивных изменений структуры и функции клеточной стенки при потреблении водонерастворимых питательных веществ [22]. Известна способность этого вида к биodeградации нефтяных загрязнений [23]. Этот биотехнологически значимый микроорганизм образует массивные биопленки на гидрофобных поверхностях и, кроме того, может являться модельным для изучения физиологических реакций условно-патогенных дрожжей этого рода. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния ОГ и ВОГ на биомассу биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194, а также на метаболическую активность, содержание внутриклеточного АТФ и проницаемость цитоплазматической мембраны клеток.

Материалы и методы

Объект исследования, материалы и условия культивирования. *C. maltosa* ВКПМ Y-194 культивировали на жидкой питательной среде (г/л): глюкоза — 50, пептон — 5, дрожжевой экстракт — 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, K_2HPO_4 — 0,1 (pH 6) в колбах Эрленмейера объемом 100 мл в течение 3 сут при 25–30°C. В работе использовали ОГ, имеющий объемную плотность 2,0–2,5 г/см³, размер частиц 10–100 мкм, более 80% моно слоя и содержащий 46% С, 49% О, 2,5% Н, 2,5% S; и вГО с объемной плотностью 0,01 г/см³, общей удельной поверхностью 700 м²/г, размером частиц 10–100 мкм, моно слоем более 80% и следующим элементным составом: 96% С, 2,7% О, 0,3% Н, 0,4% S, 0,5% N (РУСГРАФЕН, Россия). ОГ и ВОГ добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 200 мг/л.

Определение биомассы биопленки. Биопленки выращивали в лунках полистиролового плоскодонного 96-луночного планшета (Медполимер, Россия) в 200 мкл питательной среды, инокулированной 10 мкл суспензии *C. maltosa* ВКПМ Y-194 ($\text{ОП}_{540} = 1$), в течение 3 и 7 сут при 30°C. Биомассу биопленок определяли в 3 вариантах опытов: при культивировании биопленок на питательной среде с ОГ и ВОГ (200 мг/л) в присутствии планктонной культуры (1) и при первоначальной адгезии клеток *C. maltosa* ВКПМ Y-194 ($\text{ОП}_{540} = 1$) в течение 2 ч, с последующим удалением суспензии из лунок, внесением питательной среды с производными графена и ежедневной сменой среды (2), а также при культивировании на питательной среде без УНМ с последующим разрушением биопленок в присутствии ОГ и ВОГ (3). 3- и 7-суточные биопленки отмывали 0,9%-ным NaCl однократно и вносили 0,9%-ный NaCl с 200 мг/л ОГ и ВОГ на 4 ч. Контролем служил 0,9%-ный NaCl без УНМ. В 1-м и 2-м варианте опытов контролем служила питательная среда без УНМ.

После 3 и 7 сут культивирования питательную среду и планктонные клетки удаляли из лунок полистиролового планшета декантацией, биопленку отмывали 200 мкл калий-фосфатного буфера (pH 7,2 ± 0,2) дважды и окрашивали 0,1%-ным раствором кристаллического фиолетового в течение 40 мин, отмывали окрашенную биопленку калий-фосфатным буфером однократно и экстрагировали краситель в 96%-ном этиловом спирте (200 мкл) в течение 20 мин. Биомассу биопленки оценивали по оптической плотности раствора красителя при $\lambda = 540$ нм, измеренной на планшетном ридере Infinite M1000 pro (Tecan, Швейцария).

Определение метаболической активности клеток биопленок. Метаболическую активность клеток биопленок оценивали по степени восстановления 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид (methyl thiazolyl tetrazolium; Servicebio, Китай) до водонерастворимого формазана с последующей экстракцией последнего диметилсульфоксидом (ДМСО). Биопленки выращивали, как описано выше. Из лунок планшетов удаляли питательную среду, промывали калий-фосфатным буфером однократно, вносили по 160 мкл физиологического раствора и 40 мкл реагента, инкубировали 4 ч. Восстановление соли тетразолия во время метаболизма микроорганизмов приводит к образованию осадка фиолетовых кристаллов формазана, которые растворяли ДМСО и определяли оптическую плотность раствора при $\lambda = 570$ нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro (Tecan, Швейцария).

Определение содержания АТФ в клетках биопленок. Биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 выращивали в лунках полистиролового плоскодонного 96-луночного планшета (Медполимер, Россия) в 2 вариантах: 1) в питательной среде с УНМ (200 мг/л); 2) в питательной среде с последующей инкубацией в 0,9%-ном NaCl с УНМ (200 мг/л). АТФ экстрагировали, добавляя 200 мкл ДМСО к биопленкам, разводили в 10 раз деионизированной водой и 50 мкл образца смешивали с 50 мкл реагента (АТФ-реагент, БХМ СТ, Россия), содержащего люциферин и люциферазу светлячков. Интенсивность люминесценции измеряли на планшетном ридере Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Количество АТФ определяли по калибровочному графику и рассчитывали на лунку планшета.

Оценка проницаемости цитоплазматической мембраны клеток биопленок. Биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 выращивали 3 и 7 сут на предметных стеклах для микроскопии (25×75 мм). Питательную среду (25 мл) инокулировали 0,5 мл суспензии дрожжей ($\text{ОП}_{540} = 1,2$), стекла с биопленкой отмывали 0,9%-ным NaCl и инкубировали 4 ч в 0,9%-ном NaCl с 200 мг/л УНМ. После этого биопленки окрашивали в темноте 20 мин красителями LIVE/DEAD FungaLight Yeast Viability Kit

(Invitrogen, США), из расчета 3 мкл смеси красителей в равном соотношении на 1 мл физиологического раствора (0,9%-ного NaCl), инкубировали в темноте в течение 20 мин и просматривали в световом микроскопе «Leica DM LS» (Leica, Германия) с флуоресценцией. Клетки с неповрежденной мембраной окрашивались в зеленый цвет, с поврежденной — в красный.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили в программе PAST [24]. Проверка на соответствие нормальному распределению осуществлялась с помощью теста Шапиро-Уилка. Для выяснения статистической значимости влияния производных графена на биопленки использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Также для анализа достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние ОГ и ВОГ на формирование и разрушение биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194. При культивировании биопленок в присутствии суспензионной культуры биомасса биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 на среде с ОГ и ВОГ была значимо ниже, чем в контроле, а с ОГ значимо ниже, чем с ВОГ как на 3 сут, так и на 7 сут (рис. 1). При ежесуточной смене среды 3-суточные биопленки при росте с ВОГ не отличались от контроля, 7-суточные биопленки были менее массивны как на среде с ОГ, так и на среде с ВОГ. Разрушение 7-суточных биопленок было значимо больше в присутствии УНМ, что, вероятно, связано со старением биопленки. Биопленкообразование является адаптивной реакцией микроорганизмов и может усиливаться в ответ на различные факторы окружающей среды. Ингибирование биопленкообразования является следствием воздействия как на отдельные клетки (снижение жизнеспособности и адгезии клеток), так и биопленку в целом (уменьшение выработки экзополимеров, разрушение биопленки). Известно, что механизмы и стадии формирования дрожжевых биопленок в основном сходны с таковыми бактериальных биопленок [25]. При сравнении действия ОГ и ВОГ на бактерии в большинстве работ отмечено, что ВОГ за счет своей гидрофобности и повышенного сродства к липидам мембраны оказывает на бактериальные клетки более значительное повреждающее действие, чем ОГ [12–14]. Нами было отмечено, что ОГ в питательной среде сильнее снижает биопленкообразование дрожжей, чем ВОГ. Известно, что клеточная стенка дрожжей содержит около 40% маннанопротеинов, около 60% глюкозана и около 2% хитина [26], тогда как бактериальная клеточная стенка содержит пептидогликан, а у граммотрицательных — пептидогликан и наружную мембрану. Различия поверхностных свойств клеток микроорганизмов может быть причиной различного действия УНМ на их биопленкообразование.

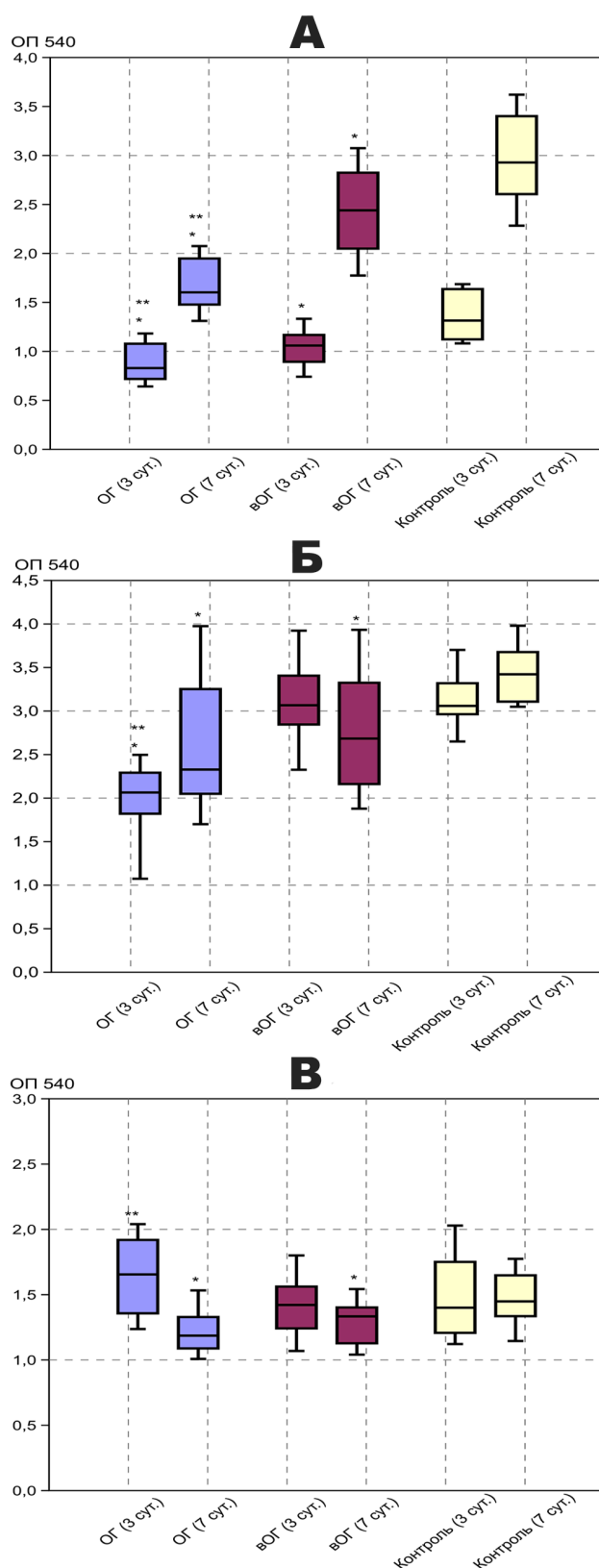


Рис. 1. Биомасса биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194 при росте с ОГ и ВОГ. **А** — рост биопленки в присутствии суспензии, **Б** — рост биопленки при ежесуточном удалении планктонных клеток, **В** — разрушение зрелой биопленки.

Представлено распределение значений в выборке: медиана, верхний и нижний квартили, максимумы и минимумы, * — статистически значимое отличие от контроля без УНМ, ** — статистически значимое отличие биомассы биопленки на среде с ОГ от таковой на среде с ВОГ (ANOVA)

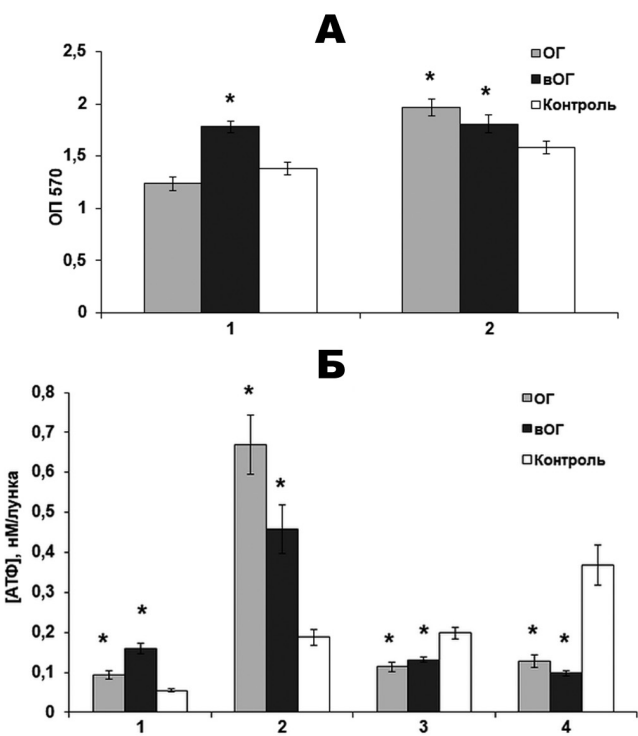


Рис. 2. Уровень метаболизма клеток 3-суточных (1, 3) и 7-суточных (2, 4) биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194 при росте (1, 2) и разрушении (3, 4) в присутствии УНМ, оцененный: **А** – по восстановлению соли тетразолия, **Б** – по содержанию внутриклеточного АТФ. Данные представлены в виде среднего $\pm$ ошибка среднего ($n = 16$), * – статистически значимое отличие от контроля без УНМ (t -критерий, $p < 0,05$)

Влияние ОГ и вОГ на метаболическую активность биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194. Метаболическую активность *C. maltosa* ВКПМ Y-194 оценивали по уровню восстановления соли тетразолия до формазана (реактив methyl thiazolyl tetrazolium), которое осуществляется дегидрогеназами живых клеток (рис. 2А). Дегидрогеназная активность клеток 3-суточных биопленок, выращенных в присутствии ОГ, не отличалась от активности клеток контрольной группы ($p > 0,05$), но была значимо выше в биопленках, образованных на среде с вОГ. Метаболическая активность 7-суточных биопленок, выращенных в присутствии УНМ, значимо превышала контрольную. Возрастание дыхательной активности клеток может быть связано как с адаптационной реакцией клеток в ответ на присутствие стрессового фактора (УНМ) в среде, так и с большей долей живых клеток в биопленке.

Влияние ОГ и вОГ на содержание АТФ в клетках биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194. При росте *C. maltosa* ВКПМ Y-194 в присутствии УНМ внутриклеточное содержание АТФ значимо превышало таковое в контроле как в 3 сут, так и в 7 сут биопленках (рис. 2Б), что коррелирует с данными по дегидрогеназной активности. Однако при оценке общей биомассы биопленки было показано снижение биопленкообразования в присутствии ОГ и вОГ. Так как кристаллический фиолетовый окрашивает не только клетки, но и полимерный

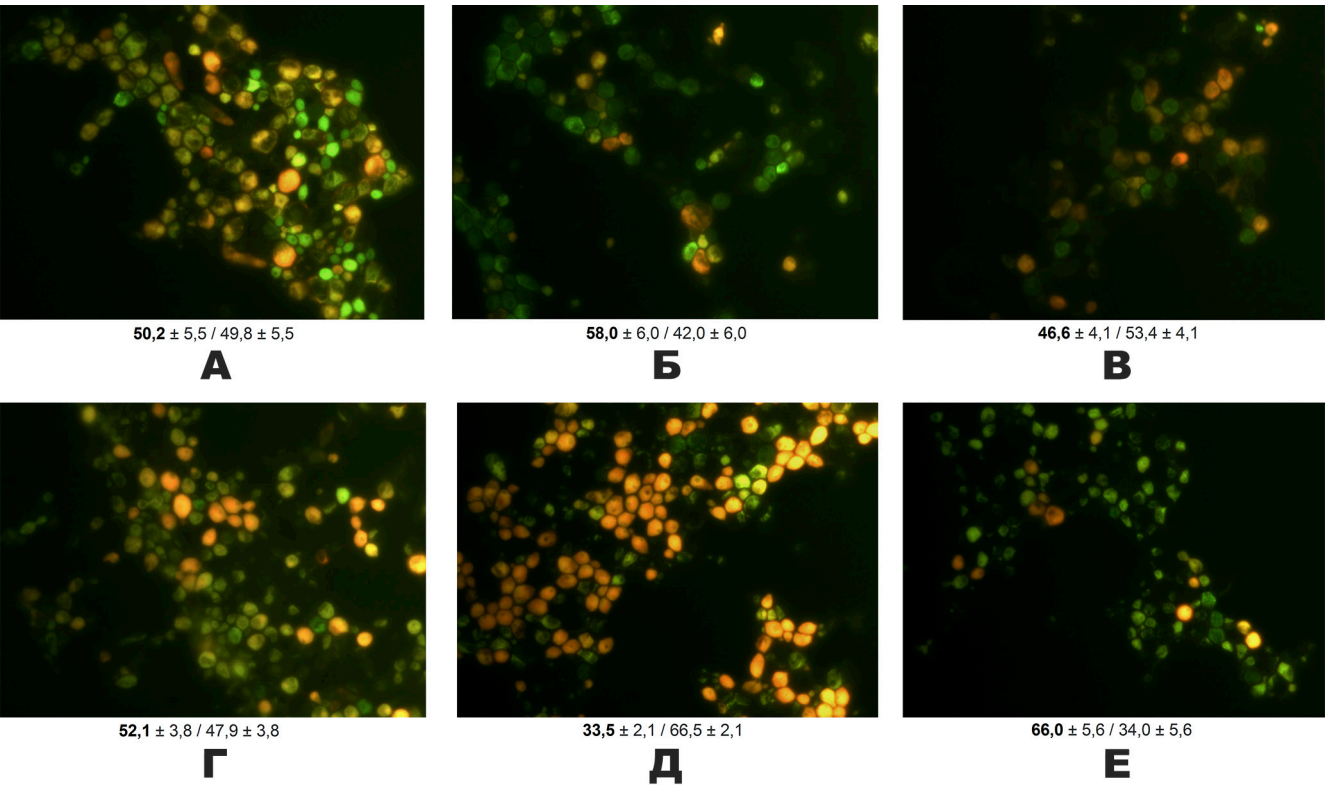


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194, окрашенных красителем Live/Dead. Зеленое окрашивание – клетки с неповрежденной мембраной; красное окрашивание – клетки с поврежденной мембраной; указано среднее %-ное соотношение (зеленые клетки / красные клетки) $\pm$ ошибка среднего ($n = 11$). **А, Б, В** – 3-суточные биопленки, **Г, Д, Е** – 7-суточные биопленки; **А, Г** – контроль, **Б, Д** – обработка ОГ, **В, Е** – обработка вОГ.

матрикс, можно выдвинуть предположение, что УНМ снижают выработку экзополимеров и воздействуют на клетки как стрессовый фактор. Возрастание содержания АТФ в клетке может быть следствием разобщения энергетического и конструктивного метаболизма, поэтому нельзя однозначно утверждать, что увеличение концентрации АТФ в биопленках, выращенных в присутствии УНМ, свидетельствует о большем количестве жизнеспособных клеток, чем в контрольной биопленке. При воздействии УНМ в течение 4 ч на зрелые биопленки, выращенные на питательной среде без УНМ, было установлено значимое снижение внутриклеточного АТФ по отношению к контролю. Это могло быть следствием более интенсивного разрушения биопленки и гибели клеток.

Влияние ОГ и ВОГ на проницаемость мембраны клеток биопленок *C. maltosa* ВКПМ У-194. Показано, что количество клеток *C. maltosa* ВКПМ У-194 с поврежденной мембраной значительно возрастает при воздействии ОГ на 7-суточные биопленки (рис. 3). При воздействии ВОГ на 3- и 7-суточные биопленки и ОГ на 3-суточные биопленки процентное соотношение мертвых клеток по сравнению с контролем не возрастает.

Кислородсодержащие группы усиливают негативное действие графена — вероятно, за счет большего сродства УНМ к поверхности клетки. Поверхность клеток *C. maltosa* ВКПМ У-194 обла-

дает значительной гидрофобностью, штамм образует массивные биопленки на полистироле, также известно о способности данного вида дрожжей к биodeградации углеводородов нефти [23]. При этом более гидрофобный УНМ (ВОГ) не обладает таким повреждающим действием на биопленки этого штамма дрожжей, что может быть связано не столько со свойствами поверхности клетки, сколько с защитным действием экзополимерного матрикса, который препятствует активной диффузии ВОГ.

Заключение

Таким образом, показано, что негативное влияние ОГ на биопленки *C. maltosa* ВКПМ У-194 более выражено, чем ВОГ. Негативное влияние УНМ более выражено по отношению к зрелым 7-суточным биопленкам, чем к 3-суточным. При этом не наблюдается как полного подавления биопленкообразования, так и полной эрадикации биопленок под воздействием этих УНМ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-20008, <https://rscf.ru/project/24-24-20008/>, Пермский край). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatt S., Punetha V.D., Pathak R., Punetha M. Graphene in nanomedicine: A review on nano-bio factors and antibacterial activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2023;226:113323.
2. Awogbemi O., Kallon D.V.V. Recent advances in the application of nanomaterials for improved biodiesel, biogas, biohydrogen, and bioethanol production. *Fuel*. 2024;358(Pt. B):130261.
3. Xia M.-Y., Xie Y., Yu C.-H., Chen G.-Y., Li Y.-H., Zhang T., Peng Q. Graphene-based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. *J. Control. Release*. 2019;307:16–31.
4. Ibukun A.E., Yahaya N., Mohamed A.H., Semail N.-F., Hamid M.A.A., Zain N.N.M., Kamaruddin M.A., Loh S.H., Kamaruzaman S. Recent developments in synthesis and characterisation of graphene oxide modified with deep eutectic solvents for dispersive and magnetic solid-phase extractions. *Microchem. J*. 2024;199:110111.
5. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol*. 2010;8(9):623–633.
6. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Dawson K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2008;105(38):14265–14270.
7. Cui F., Li T., Wang D., Yi S., Li J., Li X. Recent advances in carbon-based nanomaterials for combating bacterial biofilm-associated infections. *J. Hazard. Mater*. 2022;431:128597.
8. Maksimova Yu.G., Zorina A.S. Antibiofilm and probiofilm effects of nanomaterials on microorganisms (Review). *Appl. Biochem. Microbiol. (Mosc.)*. 2024;60(1):1–16.
9. Seifi T., Kamali A.R. Anti-pathogenic activity of graphene nanomaterials: A review. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2021;199:111509.
10. Shankar K., Agarwal S., Mishra S., Bhatnagar P., Siddiqui S., Abrar I. A review on antimicrobial mechanism and applications of graphene-based materials. *Biomater. Adv*. 2023;150:213440.
11. Hadidi N., Mohebbi M. Anti-Infective and toxicity properties of carbon based materials: graphene and functionalized carbon nanotubes. *Microorganisms*. 2022;10(12):2439.
12. Akhavan O., Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*. 2010;4(10):5731–5736.
13. Dey N., Vickram S., Thanigaivel S., Kamatchi C., Subbairi R., Karmegam N., Govarthanan M. Graphene materials: Armor against nosocomial infections and biofilm formation — A review. *Environ. Res*. 2022;214(Pt. 2):113867.
14. Guo Z., Xie C., Zhang P., Zhang J., Wang G., He X., Ma Y., Zhao B., Zhang Z. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm. *Sci. Total Environ*. 2017;580:1300–1308.

15. Saeed S.I., Vivian L., Salma C.W., Zalati C.W., Sani N.I.M., Aklilu E., Mohamad M., Noor A.M., Muthoosamy K., Kamaruzzaman N.F. Antimicrobial activities of graphene oxide against biofilm and intracellular *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *BMC Vet. Res.* 2023;19(1):10.
16. Shahnaz T., Hayder G. Exploring graphene's antibacterial potential for advanced and sustainable solutions in water treatment. *J. Water Process Eng.* 2023;56:104530.
17. Zhang X., Li Y., Zhang K., Yin Y., Wang J., Wang L., Wang Z., Zhang R., Wang H., Zhang Z. Graphene oxide affects bacteriophage infection of bacteria by promoting the formation of biofilms. *Sci. Total Environ.* 2023;880:163027.
18. Liao Y., Li S., Ji G. Graphene oxide stimulated low-temperature denitrification activity of microbial communities in lake sediments by enhancing anabolism and inhibiting cellular respiration. *Chemosphere.* 2024;350:141090.
19. Park S., Kang S.-E., Kim S.-J., Kim J. Graphene-encapsulated yeast cells in harsh conditions. *Fungal Biol.* 2023;127(10–11):1389–1396.
20. Agarwalla S.V., Ellepola K., Sorokin V., Ihsan M., Silikas N., Neto A.C., Seneviratne C.J., Rosa V. Antimicrobial-free graphene nanocoating decreases fungal yeast-to-hyphal switching and maturation of cross-kingdom biofilms containing clinical and antibiotic-resistant bacteria. *Biomater. Biosyst.* 2022;8:100069.
21. Shirshahi V., Saedi M., Nikbakht M., Mirzaii M. Unveiling the antimicrobial potential of oxidized graphene derivatives: Promising materials for advanced wound dressings and antibacterial surfaces. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023;88:104949.
22. Zvonarev A., Farofonova V., Kulakovskaya E., Kulakovskaya T., Machulin A., Sokolov S., Dmitriev V. Changes in cell wall structure and protein set in *Candida maltosa* grown on hexadecane. *Folia Microbiol. (Praha).* 2021;66(2):247–253.
23. Патент РФ 2114174 C1 Кузнецов П.А., Авчиева П.Б. Консорциум дрожжей *Candida maltosa* для биодegradации нефтезагрязнений. 1998.
24. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica.* 2001;4(1):4.
25. Alonso V.P.P., Lemos J.G., do Nascimento M. da S. Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods. *Int. J. Food Microbiol.* 2023;400:110265.
26. Калебина Т.С., Кулаев И.С. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей. *Успехи биологической химии.* 2001;41:105–130.

Поступила в редакцию 20.05.2024

После доработки 08.10.2024

Принята в печать 09.11.2024

RESEARCH ARTICLE

Effect of graphene derivatives on biofilm formation by *Candida maltosa*

E.V. Pyankova¹ , Yu.G. Maksimova^{1, 2, *} 

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Goleva st. 13, Perm, 614081, Russia;

²Perm State National Research University, Bukireva st. 15, Perm, 614990, Russia

*e-mail: yul_max@mail.ru

Graphene derivatives (oxide and its reduced form) are promising carbon nanomaterials (CNMs) used in industry, electronics, medicine and biotechnology. The aim of the work was to study the effect of graphene oxide (GO) and its reduced form (rGO) on the formation and eradication of *Candida maltosa* VKPM Y-194 biofilms, metabolic activity, intracellular ATP content and the permeability of the cytoplasmic membrane of biofilm cells. It was found that GO and rGO slightly suppress yeast biofilm formation, and the decrease in biofilm biomass during growth in the presence of GO is significantly greater than during cell growth with rGO. The destruction of mature 7-day yeast biofilms is slightly greater in the presence of CNMs than in the control, and significantly greater than that of 3-day ones. At the same time, the metabolic activity of biofilm cells, assessed by the reduction of tetrazolium salt (methyl thiazolyl tetrazolium reagent), upon contact of biofilm cells with CNM for 4 hours, significantly increased in 3-day biofilms exposed to rGO. The content of intracellular ATP in biofilms grown in the presence of CNMs exceeded that in the control, but was lower after 4-hour effect on mature biofilms grown in a nutrient medium without CNM. The greatest negative effect on the cytoplasmic membrane of biofilm cells, which was expressed in an increase in its permeability, was exerted by GO upon 4-hour exposure to a 7-day biofilm. It was found that the negative effect of CNMs on biofilms of *C. maltosa* VKPM Y-194 is more pronounced when exposed to GO than to rGO, and higher when exposed to 7-day biofilms than to 3-day ones. Complete inhibition of biofilm formation and complete eradication of mature biofilms under the effect of CNMs have not been established.

Keywords: *yeast, biofilms, graphene oxide, reduced graphene oxide, metabolic activity, ATP*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number № 24-24-20008, <https://rscf.ru/en/project/24-24-20008/>, Perm Krai.

Сведения об авторах

Пьянкова Екатерина Валерьевна — аспирант, инженер лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» — филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН. Тел.: 8-342-212-44-76; e-mail: 19katya991@rambler.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0670-3829>

Максимова Юлия Геннадьевна — докт. биол. наук, зав. лабораторией молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» — филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, проф. кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета. Тел.: 8-342-212-44-76; e-mail: yul_max@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1870-1369>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 633.81+57.085.23:575

Клональное микроразмножение розы эфиромасличной сорта «Фестивальная»: морфология, структура и плоидность микропобегов

И.В. Булавин*, Н.В. Корзина, Н.Н. Мирошниченко, Н.М. Саплев,
Д.К. Солдатов, О.М. Шевчук

«Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН», Российская академия наук,
Россия, 298648, г. Ялта, Никита, Никитский спуск, д. 52

*e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Род *Rosa* насчитывает более 200 видов и 18000 сортов, которые, помимо использования в цветоводстве, имеют экономическое значение благодаря наличию эфирного масла — источника натуральных ароматических компонентов. Продукция (эфирное масло, розовое масло, розовая вода и др.), полученная из розы эфиромасличной, используется в пищевой, парфюмерно-косметической и медицинской промышленности. Традиционное размножение растений проводят черенками, прививкой или окулировкой, которые являются сложными и трудоемкими процессами. Использование биотехнологических методов стало альтернативой вегетативному способу размножения розы. Большинство исследований направлены на подбор состава питательных сред и концентраций регуляторов роста, при этом вопросы структурной и генетической стабильности материала *in vitro* остаются дискуссионными. Целью данной работы было определение оптимальных условий культивирования *in vitro*, а также структуры, плоидности и относительного содержания ДНК микропобегов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная». Показано, что для размножения материала эффективным был вариант питательной среды Мурасиге и Скуга, содержащий 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина и 1,0 мг/л кинетина. Структурный анализ микропобегов после культивирования в течение 12 мес. выявил качественные и количественные изменения, обусловленные специфическими условиями *in vitro* и омоложением материала. Плоидность ядер в клетках листьев *in vitro* не отличалась от таковой побегов *ex situ*, как и относительное содержание ДНК (2,21 пг и 2,24 пг соответственно), что свидетельствует об определенной стабильности материала *in vitro*.

Ключевые слова: роза, межвидовой гибрид, *in vitro*, лист, световая микроскопия, проточная цитометрия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-8

Введение

Род *Rosa* насчитывает более 200 видов и 18000 сортов [1, 2]. Помимо использования в отрасли цветоводства, растения имеют экономическое значение благодаря наличию эфирного масла — источника натуральных ароматических компонентов. Эфирное масло розы — одно из самых дорогих, имеет сложный компонентный состав и содержит гераниол, нерол, цитронеллол, фарнезол, линалоол, лимонен, 1-п-ментен, мирцен и пинен в различных соотношениях. Большую ценность представляют также биологически активные вещества, в том числе дубильные, органические кислоты, бета-каротин, цианин, смолы и воск [3]. Розовое масло, розовая вода и другая

продукция из розы эфиромасличной применяются в пищевой, парфюмерно-косметической и медицинской промышленности [4, 5]. Известны четыре основных вида, используемых в производстве эфирного масла — *Rosa damascena* Mill., *Rosa gallica* L., *Rosa moschata* Herrm. и *Rosa centifolia* L. [1].

Сорт розы «Фестивальная» выведен в 1959 г. методом межвидовой гибридизации путем скрещивания *Rosa damascena* Mill. × *Rosa gallica* L. (Казанлыкской розовой с Крымской красной), авторы — Р.И. Невструева, Т.В. Фролов, А.Ф. Новомлинченко. Растения характеризуются высокой массовой долей эфирного масла (от 0,12 до 0,14 % от сырой массы), урожайностью (в зависимости от района выращивания от 15,8 до 39,0 ц/га), сбором

масла (2,1–3,3 кг/га), малотребовательны к условиям среды и агротехнике, способны к быстрой адаптации в меняющихся условиях, могут использоваться в регионах с полусухим климатом [6]. Традиционное размножение розы проводят черенкованием, прививкой или окулировкой. Это сложные и трудоемкие процессы, поэтому использование биотехнологических методов в последние десятилетия является альтернативой вегетативному способу размножения [7–10].

На сегодня для данного сорта исследованы биологические особенности роста и развития, сроки прохождения фаз, морфология вегетативных и генеративных органов [6], анатомическое строение лепестков и локализация эфирного масла [11], особенности развития, строения мужских и женских генеративных структур [12]. В биотехнологическом аспекте для розы эфиромасличной «Фестивальная» отработаны способы введения в культуру *in vitro*, произведено размножение на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением регуляторов роста растений: кинетина (Кин), 6-бензиламинопурина (6-БАП), 3-индолилуксусной кислоты (ИУК), гибберелловой кислоты (ГК₃) [4, 8, 13]; осуществлено укоренение побегов [14]; проанализировано влияние люминесцентного белого и красного света на морфогенез стеблевых эксплантов [15]. Также исследованы морфометрические параметры клеток тканей листа, его фотосинтетическая активность, определяемая методом индукции флуоресценции хлорофилла [4]. Проведен анализ структурных показателей органов микропобегов *in vitro* в сравнении с таковыми при длительном сохранении в условиях генобанка (36 мес.) [16]. Вместе с тем, отмечается недостаточная изученность факторов, лимитирующих клональное микроразмножение, и значительная зависимость процессов морфогенеза *in vitro* от генотипа [8]. Вопросы структурной организации [17], в том числе стабильности материала *in vitro* в целом [18–20], являются дискуссионными и для розы эфиромасличной остаются малоисследованными [16, 21, 22]. В связи с этим целью данной работы было определение оптимальных условий культивирования *in vitro*, анализ структуры, плоидности и относительного содержания ДНК микропобегов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная».

Материалы и методы

В качестве объекта исследования выбрана роза эфиромасличная (*Rosa damascena* Mill. × *Rosa gallica* L.) сорта «Фестивальная», культивируемая *ex situ* на коллекционных участках Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (ФГБУН «НБС-ННЦ»), расположенных на высоте 200 м над уровнем моря,

в условиях субтропического климата средиземноморского типа.

Растительный материал для введения в культуру *in vitro* промывали под проточной водой с моющим средством и ополаскивали 3 раза дистиллированной водой. Сегменты побегов с вегетативными почками последовательно погружали в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), 1%-ный раствор Тимеросала (20 мин) и 0,3%-ный раствор препарата ДезТаб (активный хлор 48–53%) с добавлением 3 капель детергента Твин-20 (15 мин). После каждого стерилизующего вещества сегменты трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

В условиях ламинарного бокса SC2 (ESCO, Сингапур) от почек отделяли кроющие чешуи и материал (0,7–1,0 см) помещали на поверхность питательной среды МС [23], дополненной 1,0 мг/л 6-БАП, 0,25 мг/л ГК₃, 0,15 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК). На этапе микроразмножения побеги розы длиной 1,0 см субкультивировали на питательной среде МС, содержащей, в зависимости от варианта опыта, 0,5, 1,0 или 1,5 мг/л 6-БАП; 0,5, 1,0 или 1,5 мг/л Кин; 0,5 мг/л ГК₃ и 1,0 6-БАП на фоне неизменного присутствия 0,15 мг/л НУК. Контролем служила среда МС без регуляторов роста. Субкультивирование проводили каждые 30 сут. Общий срок культивирования составил 12 мес. Материал содержали в фитокапсулах «БИОТРОНа» при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ под лампами дневного света L36W/765 Cool Daylight (OSRAM, Россия).

Морфологию листьев растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* исследовали при помощи стереомикроскопа SMZ745T (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой DC29111251 (View Solutions, Китай) и программным обеспечением (ПО) ImageView v. x64, 3.7.10121.20171030. Цвет органов растений определяли согласно шкале А.С. Бондарцева [24].

Анатомический анализ проводили в апреле-мае 2023 г. на фиксированном материале. Для этого от 10 растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* отделяли парные листочки сложного листа, фрагменты стеблей и сразу переносили в пенициллиновые флаконы с раствором формалина (38%), ледяной уксусной кислоты, спирта этилового (96%) и воды (1:0,5:5:3,5). Дополнительно добавляли несколько капель детергента Твин-20. Обезвоживание материала осуществляли в спиртах восходящей концентрации. В качестве промежуточной жидкости использовали толуол (Вектон, Россия). Материал заключали в парафиновую гомогенизированную среду Гистопoint Экстра (МедТехника-Поинт, Россия). Срезы толщиной 8–10 мкм изготавливали на полуавтоматическом ротационном микротоме Ротмик 2А (ОрионМедик, Россия), наклеивали на предметные стекла, предварительно обработанные раствором белка куриного яйца,

смешанным с глицерином в соотношении 1:1. Стекла со срезами сушили при помощи нагревательного столика Микростат-30/80 (Техном, Россия). Депарафинирование осуществляли толуолом в стеклянных емкостях Шиффердекера (2 ч). После предметные стекла со срезами переносили в 96%-ный спирт (1,5 ч), дистиллированную воду (10 мин), окрашивали водным раствором метиленовой сини (0,05%) (30 мин). Для заключения использовали раствор сахарозы (60%).

Полученные препараты исследовали с помощью микроскопа CX-41 (Olympus, Япония), оснащенного цифровой камерой SC 50 (Olympus, Германия) и ПО CellSens Imaging Software v. 1.17. Подсчет количественных анатомических показателей выполняли на цифровых изображениях с использованием ПО UTHSCSA ImageTool v. 3.00. Для образцов *ex situ* и *in vitro* анализировали по 30 клеток.

Исследование уровня ploидности и относительного содержания ДНК проводили на свежем материале. Части листочков сложного листа (около 0,5 см²) от 10 побегов *ex situ* и микропобегов *in vitro* помещали в WPB-буфер [25] с модификациями в виде увеличения содержания поливинилпирролидона (K10) до 2%, дополненный пропиций йодидом (50 мкг/мл), РНКазой (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанолом (0,3%), измельчали при помощи лезвия безопасной бритвы. Полученные образцы пропускали через фильтр CellTrics® (Partec, Германия) с диаметром пор 30 мкм. Анализ материала проводили с применением CyFlow® Ploidy Analyzer (Sysmex, Partec, Германия). В качестве внешнего контроля использовали растения *Ficus benjamina* L. [26]. Измерения проводили на одинаковых настройках анализатора с количеством ядер 5000–10000.

Статистический анализ выполняли с использованием ПО Past v. 4.03 [27]. Выборки проверяли на нормальность распределения и, в зависимости от полученного результата, использовали либо *t*-критерий, либо U-тест при $p \leq 0,05$. Табличные данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего значения ($\pm m$).

Результаты и обсуждение

Основные этапы клонального микроразмножения — это стерилизация исходных эксплантов с введением их в условия *in vitro*, размножение, укоренение и адаптация полученных растений к нестерильным условиям. Для этого необходимо подобрать действенный и безопасный антисептик, физические факторы культивирования, состав питательной среды, тип и концентрации регуляторов роста, соответствующие конкретному этапу и поставленной задаче, учитывая особенности генотипа используемого материала [10, 28, 29].

При отработке приемов стерилизации способ с последовательным применением 70%-ного рас-

твора этилового спирта, 1%-ного раствора Тиме-росала и 0,3%-ного раствора препарата ДезТаб позволил получить 80,5% стерильных эксплантов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная», которые помещали на питательную среду МС, содержащую 1,0 мг/л 6-БАП, 0,25 мг/л ГК₃, 0,15 мг/л НУК. Развертывание листьев наблюдали через 3 сут после введения в культуру *in vitro*, при этом первый пассаж характеризовался низким коэффициентом размножения (1,2%).

Побеги с 2–6 листьями, развившиеся из эксплантов через 30 сут после введения в стерильные условия, переносили на питательную среду для индукции множественного побегообразования, дополненную регуляторами роста. Известно, что на успешную реализацию морфогенетического потенциала влияет баланс цитокининов и ауксинов в составе питательной среды. Превалирование цитокининов в этом соотношении способствует повышению коэффициента размножения микропобегов [30–34]. В ряде публикаций указывается, что применение 6-БАП в качестве основного регулятора роста для эксплантов розы садовой и розы эфиромасличной на этапе размножения является наиболее эффективным по сравнению с Кин [13, 28, 32, 35, 36]. Также имеются данные, что введение в питательную среду ГК₃ оказывает положительное влияние на адвентивное побегообразование [8, 13, 37–39]. В наших исследованиях морфогенетический потенциал розы эфиромасличной «Фестивальная» изучали на среде МС, содержащей 6-БАП, Кин и ГК₃. Способность к органогенезу определяли по количеству микропобегов, развившихся в течение 30 сут на одном экспланте.

Как показали результаты, побегообразование с различной интенсивностью происходило во всех вариантах опыта. На питательной среде без регуляторов роста микропобеги были малочисленными ($1,1 \pm 0,18$ шт.), отмечены единичные случаи спонтанного ризогенеза. Варианты среды МС с 0,5 мг/л Кин или 0,5 мг/л 6-БАП незначительно стимулировали побегообразование — $1,2 \pm 0,51$ и $1,9 \pm 0,44$ шт. соответственно. Увеличение содержания 6-БАП в среде до 1,0 мг/л позволило получить $3,7 \pm 0,17$ микропобегов с небольшими листьями, которые желтели в нижней части стебля к завершению срока культивирования. Повышение концентрации Кин до 1,0 мг/л не способствовало увеличению побегообразования ($1,2 \pm 0,13$ шт.), при этом микропобеги удлинялись, увеличивались размеры листьев, что позволяет в дальнейшем применять среду с Кин для элонгации материала. При введении 1,0 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л Кин количество побегов ($3,9 \pm 0,26$ шт.) и листьев ($3,68 \pm 0,21$ шт.) превышало результаты контрольного варианта. Зеленый цвет листьев сохранялся на протяжении срока культивирования. В варианте опыта с 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ГК₃ в те-

чение одного субкультивирования развилось $3,9 \pm 0,25$ шт. дополнительных микропобегов. Необходимо отметить, что у 30% эксплантов наблюдали разрастание и потемнение базальной части побега, в отдельных случаях формировались глобулы каллуса белого цвета. При введении в среду 1,5 мг/л 6-БАП количество микропобегов увеличивалось и достигало $4,1 \pm 0,34$ шт., возрастало и число листьев, при этом происходило уменьшение размеров листочков сложного листа, рахиса, дополнительных микропобегов, из которых формировались шарообразные конгломераты. Важно отметить, что развитие дополнительных микропобегов проходило в более длительные сроки и составило 45–55 сут (по сравнению с 30 сут культивирования на среде с 1,0 мг/л 6-БАП). Вариант среды МС с 1,5 мг/л Кин не был эффективным, активное побегообразование не отмечалось, крупные листья желтели.

Таким образом, оптимальными для индукции побегообразования у сорта «Фестивальная» оказались два варианта среды МС, содержащие: а) 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ГК₃ (что согласуется с данными, полученными для эксплантов эфиромасличной розы «Радуга» и «Мичуринка» [8]) и б) 1,0 мг/л 6-БАП + 1,0 мг/л Кин.

Изучение анатомического строения растений *in vitro* проводят по нескольким направлениям: 1) выявление аномалий, 2) оптимизация условий культивирования, 3) оценка возможностей адаптационного характера к условиям *ex vitro* [20]. Нами проведен морфолого-анатомический анализ листьев и стеблей растений *ex situ* и микропобегов *in vitro*.

Для растений *ex situ* розы эфиромасличной «Фестивальная» характерен сложный непарноперистый лист, состоящий из рахиса, 5–7 листочков и двух прилистников, сросшихся с основанием черешка и свободных в верхней части (рис. 1А). Верхний непарный и боковые парные листочки зеленого (Е5 по шкале А.С. Бондарцева) или желто-зеленого цвета (И2), с малиновым оттенком (Д6) на абаксиальной поверхности. Форма непарного листочка эллиптическая или продолговато-яйцевидная, боковых парных – эллиптическая или обратно-яйцевидная. Верхушка непарного листочка заостренная, основание сердцевидное, выемчатое или округлое, край пильчатый или пильчато-городчатый (ближе к верхушке). Морфология парных листочков подобна непарным, при этом верхушка может быть округлой, а основание широко-клиновидным. Жилкование перисто-сетчатое. Кроющие

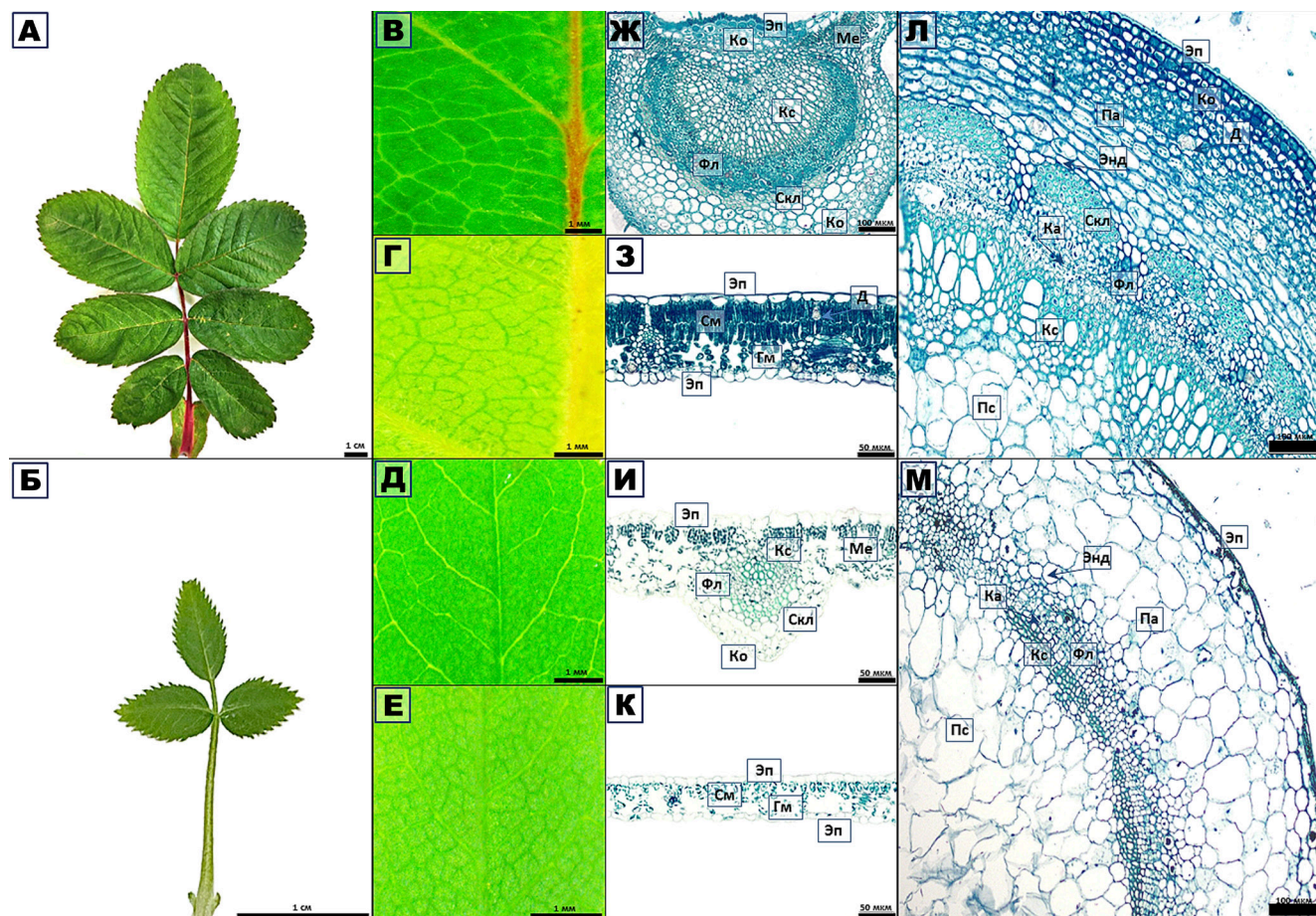


Рис. 1. Морфология (А–Е) и анатомия листочков (Ж–К), стеблей (Л–М) розы эфиромасличной сорта «Фестивальная» *ex situ* (А, В, Г, Ж, З, Л) и *in vitro* (Б, Д, Е, И, К, М). Гм – губчатый мезофилл, Д – друза, Ка – камбий, Ко – колленхима, Кс – ксилема, Ме – мезофилл, Па – паренхима, Пс – паренхима сердцевины, Скл – склеренхима, См – столбчатый мезофилл, Фл – флоэма, Энд – эндодерма, Эп – эпидерма (световая микроскопия).

трихомы (редкие) обнаруживали с двух сторон в области центральной и боковых жилок, с наибольшим их количеством на абаксиальной поверхности (рис. 1В, Г). Устьица локализовались на нижней стороне листочков, по периферии на концах зубчиков наблюдали гидатоды.

Рахис на адаксиальной стороне по цвету был малиновым (Д6), с абаксиальной — желто-зеленым (Б3). На всей поверхности обнаруживали головчатые трихомы, редкие шипы.

Проведен анализ структуры листочков первой верхней пары сложного листа. В области центральной жилки (рис. 1Ж) выделяли эпидерму, покрывающую кутикулой, колленхиму, закрытый коллатеральный пучок, окруженный склеренхимой на разной стадии дифференциации, которая с нижней части подстилалась паренхимой с утолщенными клеточными стенками и колленхимой, за которыми следовала покровная ткань. В боковой части листочка на поперечном срезе (рис. 1З) обнаруживали: верхнюю эпидерму, составленную из клеток овально-прямоугольной формы, покрытых кутикулой с внешней стороны; дифференцированный мезофилл, представленный двумя слоями клеток палисады, довольно плотно примыкающих друг к другу; 3–4 слоя губчатого мезофилла, составленного округлыми и овальными клетками; нижнюю однорядную эпидерму, состоящую из округлых/овальных клеток, высота и ширина которых была меньше таковых клеток верхней эпидермы в 1,2 и 1,4 раза соответственно. В области центральной и боковых жилок в клетках наблюдали включения в виде друз.

Исследовано строение однолетних неодревесневевших стеблей (рис. 1Л). Снаружи осевые органы были покрыты эпидермой, состоящей из мелких прямоугольных клеток, на внешних тангентальных клеточных стенках которых выявляли кутикулу. Колленхима, располагалась под покровной тканью неравномерно и формировала от 3 до 6–7 слоев. Ассимиляционная паренхима состояла из овальных или округлых клеток в виде 6–10 слоев, в которых были заметны включения в виде друз. Эндодерма была достаточно заметна. Далее располагался центральный цилиндр, в котором наблюдали склеренхиму перициклического происхождения (могла отсутствовать), первичную и вторичную флоэму, камбий, вторичную и первичную ксилему. Сердцевина состояла из паренхимных клеток округлой или овальной формы. Наличие отдельных пучков явилось свидетельством незавершенности перехода к непучковому типу строения.

У микропобегов *in vitro* розы эфиромасличной «Фестивальная» (1,5–2,5 см высотой) на рахисе (длиной 0,5–1,2 см) формировалось три листочка (один непарный и два парных), в базальной — находились прилистники, сросшиеся с черешком (рис. 1Б). Верхний непарный и боковые парные листочки были зеленого (Е5) или желто-зеленого

цвета (И2), с малиновым оттенком (Д6) на абаксиальной поверхности. Листочки по форме яйцевидные или эллиптические с заостренной верхушкой, округлым или выемчатым (непарные листочки) основанием, пильчатым краем. Тип жилкования перисто-сетчатый. Кроющие трихомы отсутствовали (рис. 1Д, Е), устьица локализовались на абаксиальной стороне, по периферии листочков на концах зубчиков обнаруживали гидатоды, на абаксиальной стороне вдоль центральной и боковых жилок находились редко расположенные головчатые трихомы.

Общий план анатомического строения листочков и стебля микропобегов розы эфиромасличной «Фестивальная» в условиях *in vitro* сохранялся сравнительно со структурой побегов *ex situ* (рис. 1И, К, М). Среди качественных анатомических изменений в листочках можно отметить уменьшение кутикулярного слоя и количества механических тканей (колленхимы под эпидермой и склеренхимы в нижней части проводящего пучка). Снижение степени развития механических тканей также было характерным и для стебля. Исследование количественных показателей тканей и клеток листочков на поперечных срезах выявило уменьшение высоты в области центральной жилки и боковой части органов, высоты и ширины проводящего пучка, клеток верхней эпидермы, столбчатого и губчатого мезофилла, высоты слоев мезофилла, количества проводящих элементов (ксилемы) (таблица). В литературе также имеются сведения об изменениях структуры органов растений/микропобегов *in vitro* под влиянием специфических условий культивирования [17, 20, 21]. Следует отметить, что существенные перестройки в анатомии отмечаются только при введении неоптимальных концентраций регуляторов роста в состав питательной среды, что находит свое подтверждение в работах других исследователей [20]. Большое количество регуляторов роста является причиной морфологических девиаций органов вследствие изменения их клеточной и тканевой организации. Полученные нами данные демонстрируют вариации некоторых морфологических и анатомических характеристик, связанных с омоложением растений вследствие культивирования *in vitro*.

В литературе отмечено, что омоложение *in vitro* может сопровождаться перестройками генома. Проточная цитометрия — метод, используемый для оценки изменений ploидности и содержания ДНК, в том числе у растений, получаемых биотехнологическим способом. Он достаточно быстрый, точный и позволяет исследовать большое количество клеток/ядер за меньшее время [40], и, согласно имеющимся сведениям, также используется для установления генетических изменений между материалом *in vitro* и материнскими растениями, как в комплексе с молекулярными маркерами [40–42], так и в отдельности [43, 44].

Таблица
Количественные анатомические показатели листочков розы
эфиромасличной сорта «Фестивальная» *ex situ* и *in vitro*

Параметр	<i>Ex situ</i>	<i>In vitro</i>
Высота листочка в области центральной жилки	423,36 ± 20,39	189,99 ± 9,19*
Высота проводящего пучка	152,68 ± 13,82	51,88 ± 3,82*
Ширина проводящего пучка	276,82 ± 15,13	97,85 ± 6,72*
Количество элементов ксилемы	57,6 ± 3,47	22,40 ± 2,50*
Высота листочка в боковой части	132,11 ± 4,28	89,29 ± 3,83*
Высота клеток верхней эпидермы	18,83 ± 0,70	14,69 ± 0,39*
Ширина клеток верхней эпидермы	28,16 ± 1,01	21,67 ± 1,41*
Высота клеток нижней эпидермы	15,30 ± 0,55	11,89 ± 0,47*
Ширина клеток нижней эпидермы	19,93 ± 1,04	17,71 ± 0,89
Количество слоев столбчатого мезофилла	2,00 ± 0,00	1,60 ± 0,16*
Высота клеток столбчатого мезофилла	33,16 ± 0,63	20,42 ± 0,69*
Ширина клеток столбчатого мезофилла	6,99 ± 0,14	7,80 ± 0,26*
Высота слоев столбчатого мезофилла	61,59 ± 3,23	28,87 ± 2,52*
Количество слоев губчатого мезофилла	3,40 ± 0,16	2,60 ± 0,16*
Высота клеток губчатого мезофилла	10,35 ± 0,28	11,88 ± 0,61*
Ширина клеток губчатого мезофилла	11,85 ± 0,34	13,12 ± 0,71
Высота слоев губчатого мезофилла	43,10 ± 2,62	41,48 ± 3,98

Примечание: * – статистически значимое различие между материалом *ex situ* и *in vitro*, при $p \leq 0,05$.

По данным литературы *R. damascena* [45, 46] и *R. gallica* [45–47] являются тетраплоидами. Содержание ДНК у *R. damascena* составляет 2,16, 2,26 пг [45, 46], *R. gallica* – 2,20 пг [46, 47]. Нами проведен анализ ploидности ядер и относительного содержания ДНК в клетках листьев *in vitro* в сравнении с таковыми *ex situ* розы эфиромасличной «Фести-

вальная» (*R. damascena* × *R. gallica*). Согласно полученным результатам, уровень ploидности растений не различался (рис. 2). Относительное содержание ДНК в ядрах клеток листьев побегов *ex situ* и микропобегов *in vitro* составило $2,21 \pm 0,04$ и $2,24 \pm 0,02$ пг соответственно, что свидетельствует об определенной стабильности материала *in vitro*. Подобные результаты были получены и для других культур. Так, сохранение ploидности и содержания ДНК в культуре *in vitro* показано для дыни при прямом органогенезе, при этом отмечено, что использование культуры ткани способствует изменению уровня ploидности [42]. Анализ содержания ДНК растений *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill., полученных *in vitro* путем прямого и непрямого органогенеза, а также через соматический эмбриогенез, не выявил существенных различий по искомому показателю в сравнении с таковым материнских растений [41]. В то же время, при исследовании *Cattleya tigrina* A. Rich. *in vitro* выявлены регенеранты (26,5%) с уровнем ploидности, увеличенным в два раза. Отмечено возможное влияние эндоредупликаций, происходящих непосредственно в интактных тканях орхидных [43]. В наших исследованиях показано отсутствие изменений, что является свидетельством стабильности *in vitro* непосредственно исследованного нами генотипа и оптимальности разработанного протокола.

Закключение

На основании биометрических показателей эксплантов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная» установлено, что наиболее эффективным для размножения микропобегов в культуре *in vitro* является вариант питательной среды МС, содержащий 1,0 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л Кин. Исследование анатомии листочков сложного листа и микростеблей *in vitro* показало отсутствие существенных структурных перестроек, при этом выявлены качественные и количественные изменения, связанные

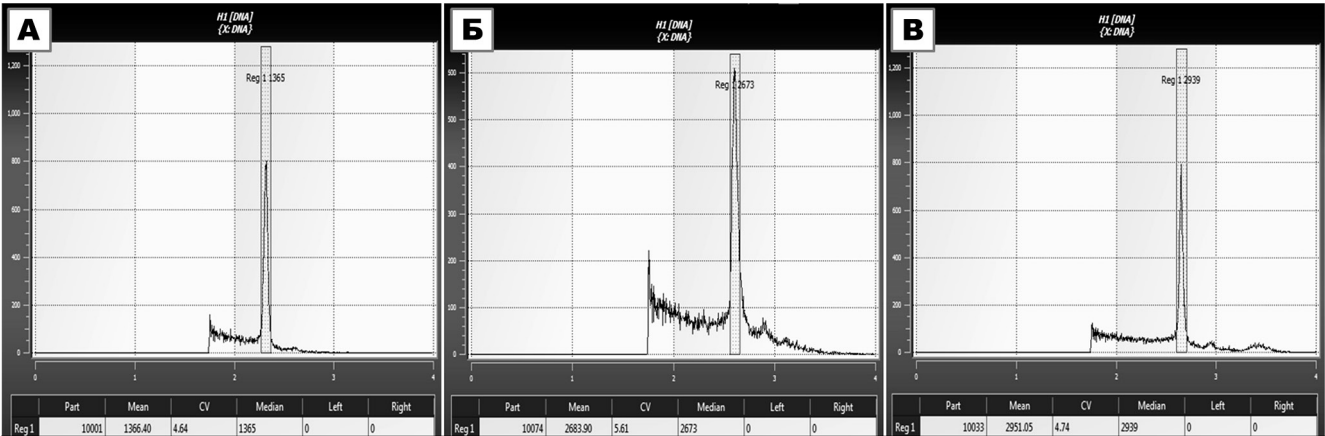


Рис. 2. Гистограммы ploидности исследуемого материала. А – образец ядер, выделенных из листовой пластинки *Ficus benjamina* (внешний контроль), Б – образец ядер, выделенных из клеток листочков розы эфиромасличной сорта «Фестивальная» *ex situ*, В – образец ядер, выделенных из клеток листочков розы эфиромасличной «Фестивальная» *in vitro*.

с условиями культивирования и омоложением материала. Анализ пloidности и относительного содержания ДНК методом проточной цитометрии не выявил существенных сдвигов, что свидетельствует о стабильности исследуемого показателя у розы эфиромасличной «Фестивальная» после 12 мес. культивирования *in vitro*. Полученные данные являются подтверждением действенности разработанного протокола для получения идентичных клонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baydar H., Baydar N.G. The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Ind. Crop. Prod.* 2005;21(2):251–255.
2. Venkatesha K.T., Gupta A., Rai A.N., Jambhulkar S.J., Bisht R., Padalia R.C. Recent developments, challenges, and opportunities in genetic improvement of essential oil-bearing rose (*Rosa damascena*): A review. *Ind. Crop. Prod.* 2022;184(15):114984.
3. Zolotilov V., Nevkrytaya N., Zolotilova O., Seitadzhieva S., Myagkikh E., Pashtetskiy V., Karpukhin M. The essential-oil-bearing rose collection variability study in terms of biochemical parameters. *Agron.* 2022;12(2):529.
4. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфиромасличной. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2015;2(13):37–48.
5. Katekar V.P., Rao A.B., Sardeshpande V.R. Review of the rose essential oil extraction by hydrodistillation: An investigation for the optimum operating condition for maximum yield. *Sustain. Chem. Pharm.* 2022;29:100783.
6. Марко Н.В. Биоморфобиологические особенности розы эфиромасличной сорта Фестивальная при выращивании на ЮБК и в степном Крыму. *Таврический вестник аграрной науки.* 2020;4(24):98–113.
7. Pati P.K., Kaur N., Sharma M., Ahuja P.S. *In vitro* propagation of rose. *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Methods in molecular biology, vol 589.* Eds. S. Jain and S. Ochatt. N.Y., Dordrecht, Heidelberg, L.: Springer, Humana Press; 2010:163–176.
8. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Микроразмножение сортов эфиромасличной розы в культуре *in vitro*. *Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле».* 2016;2:45–52.
9. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro*. *Бюлл. Гл. бот. сада.* 2005;2(201):78–82.
10. Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. *Plants from test tubes: An introduction of micropropagation* – 4th ed. Portland: Timber Press; 2013. 274 pp.
11. Семенова Е.Ф., Меженная Н.А., Преснякова Е.В. Анатомо-морфологические особенности лепестков как эфиромасличных структур цветков представителей рода *Rosa*. *ИВУЗ ПР Естественные науки.* 2014;3(7):5–17.
12. Шевченко С.В., Кузьмина Т.Н. Некоторые особенности эмбриологии представителей видов *Rosa spinosissima* L., *R. canina* L. и сортов *R. × damascena* Mill. в норме и при вирусной инфекции. *Сельскохозяйственная биология.* 2018;53(3):624–633.
13. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и факторов культивирования на клональное микроразмножение розы эфиромасличной. *Бюллетень ГНБС.* 2016;120:36–43.
14. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и состава питательной среды на укоренение розы эфиромасличной при микроразмножении *in vitro*. *Биомика.* 2018;10(1):11–15.
15. Корзина Н.В., Митрофанова И.В. Интенсивность освещения и морфогенез розы эфиромасличной в культуре *in vitro*. *Бюллетень ГНБС.* 2022;145:157–163.
16. Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V. Structure of vegetative organs in essential oil rose under standard culture conditions and long-term conservation *in vitro*. *Acta Hortic.* 2021;1315:185–190.
17. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. *Microsc. Microanal.* 2021;27(3):626–634.
18. Kritskaya T.A., Kashin A.S., Kasatkin M.Y. Micropropagation and somaclonal variation of *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) *in vitro*. *Russ. J. Dev. Biol.* 2019;50(4):209–215.
19. Bulavin I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova I.V. *In vitro* regeneration of *Hyssopus officinalis* L. and plant genetic similarity. *Dokl. Biol. Sci.* 2021;499(1):109–112.
20. Plugatar Y.V., Bulavin I.V., Ivanova N.N., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M., Shevchuk O.M., Feskov, S.A., Naumenko, T.S. Study of the component composition of essential oil, morphology, anatomy and ploidy level of *Hyssopus officinalis* f. *cyaneus* Alef. *Horticulturae.* 2023;9(4):480.
21. Mitrofanova I., Tsyupka V., Jain S.M. Morpho-anatomical characterization of *in vitro* regenerated plants. *Advances in plant tissue culture. Current Developments and Future Trends.* Eds. A.C. Rai, A. Kumar, A. Modi, and M. Singh. Cambridge: Academic Press; 2022:175–204.
22. Zakaria H.M., Dessoky E.S., Ismail I.A., Attia A.O., El-Hallous E.I. Analysis of genetic stability of the *in vitro* propagated *Rosa damascena* (Taif rose) plant. *Int. J. Adv. Res.* 2017;5(4):117–122.
23. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962;15(3):473–497.
24. Novikov A., Sokolov S., Drapalyuk M., Zelikov V., Ivetic V. Performance of scots pine seedlings from seeds graded by colour. *Forests.* 2019;10(12):1064.
25. Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann. Bot.* 2007;100(4):875–888.

26. Skaptsov M.V., Smirnov S.V., Kutsev M.G., Shmakov A.I. Problems of standartization in flow cytometry of plants. *Turczaninowia*. 2016;19(3):120–122.
27. Hammer Ø.H., David A.T., Paul D.R. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 2001;4(1):4.
28. Pati P.K., Rath S.P., Sharma M., Sood A., Ahuja P.S. *In vitro* propagation of rose – a review. *Biotechnol. Adv.* 2006;24(1):94–114.
29. Baig M.M.Q., Hafiz I.A., Hussain A., Ahmad T., Abbasi N.A. An efficient protocol for *in vitro* propagation of *Rosa gruss an teplitz* and *Rosa centifolia*. *Afr. J. Biotechnol.* 2011;10(22):4564–4573.
30. Carelli B.P., Echeverrigaray S. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Sci Hortic.* 2002;92(1):69–74.
31. Roy P.K., Manum A.N.K., Ahmed G. *In vitro* plantlets regeneration of rose. *Plant Tissue Cult.* 2004;14(2):149–154.
32. Jabbarzadeh Z., Khosh-Khui M. Factors effecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Sci. Hort.* 2005;105(4):475–482.
33. Razavizadeh R., Ehsanpour A.A. Optimization of *in vitro* propagation of *Rosa hybrida* cultivar Black Red. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2008;3(1):96–99.
34. Мухамбетжанов С.К., Нам С.В., Вечерко Н.А., Мурсалиева В.К. Факторы, влияющие на рост и развитие роз *in vitro*. *Биотехнология. Теория и практика*. 2010;1:41–53.
35. Nikbakht A., Kafi M., Mirmasoumi M., Babalar M. Micropropagation of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar. *Int. J. Agric. Biol.* 2005;7(4):535–538.
36. Podwyszyńska M., Orlikowska T., Trojak-Goluch A., Wojtania A. Application and improvement of *in vitro* culture systems for commercial production of ornamental, fruit, and industrial plants in Poland. *Acta Soc. Bot. Pol.* 2022;91(1):914.
37. Noodezh H.M., Moieni A., Baghizadeh A. *In vitro* propagation of the Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2012;48(6):530–538.
38. Rout G.R., Debata B.K., Das P. *In vitro* clonal multiplication of roses. *Proc. Natl. Acad. Sci. India.* 1990;60:311–318.
39. Vijaya N., Satyanarayana G., Prakash J., Pierik R.L.M. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.* 1991;12:209–214.
40. Mangain J., Mujib A., Ejaz B., Gulzar B., Malik M.Q., Syeed R. Flow cytometry and start codon targeted (SCoT) genetic fidelity assessment of regenerated plantlets in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2022;150(1):129–140.
41. Abdolinejad R., Shekafandeh A., Jowkar A., Gharaghani A., Alemzadeh A. Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2020;143:131–144.
42. Raji M.-R., Farajpour M. Genetic fidelity of regenerated plants via shoot regeneration of muskmelon by inter simple sequence repeat and flow cytometry. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 2021;20(2):88–89.
43. Fritsche Y., Deola F., da Silva D.A., Holderbaum D.F., Guerra M.P. *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) *in vitro* regeneration: main factors for optimal protocorm-like body induction and multiplication, plantlet regeneration, and cytogenetic stability. *S. Afr. J. Bot.* 2022;149:96–108.
44. Catalano C., Carra A., Carimi F., Motisi A., Saje-va M., Butler A., Lucretti S., Giorgi D., Farina A., Abbate L. Somatic embryogenesis and flow cytometric assessment of nuclear genetic stability for *Sansevieria* spp.: an approach for *in vitro* regeneration of ornamental plants. *Horticulturae*. 2023;9(2):138.
45. Yokoya K., Roberts A.V., Mottley J., Lewis R., Brandham P.E. Nuclear DNA amounts in roses. *Ann. Bot.* 2000;85(4):557–561.
46. Doğan E., Kazaz S., Kiliç T., Dursun H., Ünsal T.H., Uran M. A research on determination of the performance *Rosa damascena* Mill. as pollen source in rose breeding by hybridization. *Uluslararası Tarla Bitkileri Kongresi Özel Sayısı*. 2020;14:194–201.
47. Harmon D.D., Chen H., Byrne D., Liu W., Ranney T.G. Cytogenetics, ploidy, and genome sizes of rose (*Rosa* spp.) cultivars and breeding lines. *Ornam. Plant Res.* 2023;3:10.

Поступила в редакцию 30.05.2024

После доработки 08.10.2024

Принята в печать 11.11.2024

RESEARCH ARTICLE

Clonal micropropagation of the essential oil rose cultivar “Festivalnaya”: morphology, anatomy and microshoots’ ploidy level

I.V. Bulavin^{*} , N.V. Korzina , N.N. Miroshnichenko , N.M. Saplev ,
D.K. Soldatov , O.M. Shevchuk 

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Nikitskiy spusk 52, Nikita, Yalta, 298648, Russia

^{*}e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

The genus *Rosa* includes more than 200 species and 18,000 cultivars, which, in addition to being used in floriculture, are of economic importance due to the presence of essential oil, a source of natural aromatic components. Products (essential oil, rose oil, rose water, etc.) obtained from essential-bearing oil rose are used in the food, perfume, cosmetic and medical industries. Traditional rose propagation is carried out by cuttings, grafting or budding, which are complex

and time-consuming processes. Biotechnological methods have become an alternative to the vegetative method of rose propagation. The main studies are aimed at selecting the mineral composition of nutrient media and concentrations of growth regulators, while the issues of structural and genetic stability of the material *in vitro* are still discussed. Therefore, the work aimed to determine the optimal conditions for *in vitro* cultivation, structure, ploidy, and relative DNA content of essential oil rose microshoots. Essential oil rose cultivar “Festivalnaya” (*Rosa damascena* Mill × *Rosa gallica* L.) was used as the material. Buds were sterilized and transferred on the Murashige-Skoog modified medium supplemented with 1.5 mg/l 6-benzylaminopurine (6-BAP), 0.25 mg/l gibberellic acid (GA₃), 0.15 mg/l α-naphthylacetic acid. Micropropagation of the obtained microshoots was carried out on the Murashige-Skoog culture medium containing 1.0 mg/l 6-BAP; 1.0 mg/l kinetin (Kin); 1.0 mg/l 6-BAP + 1.0 mg/l Kin; 1.0 mg/l 6-BAP + 0.5 mg/l GA₃. The structure analysis was carried out according to the generally accepted methods. Ploidy and relative DNA content were determined by flow cytometry. Induction of direct organogenesis *in vitro* from vegetative buds of essential oil rose was carried out. At the stage of micropropagation, the maximum number of adventitious microshoots was obtained on Murashige-Skoog medium with the introduction of 1.0 mg/l 6-BAP and 1.0 mg/l Kin. Structural analysis of microshoots after subculturing for 12 months revealed qualitative and quantitative changes due to specific *in vitro* conditions and material rejuvenation. The ploidy level of the leaf blade nuclei *in vitro* did not differ from those of *ex situ* shoots. The relative content of DNA in the leaf nuclei of shoots *ex situ* and microshoots *in vitro* was 2.21 pg and 2.24 pg, respectively, which indicates a certain stability of the material *in vitro*.

Keywords: *Rosa*, interspecific hybrid, *in vitro*, leaf, light microscopy, flow cytometry

Funding: This study was performed under the state assignment of the FSFIS «NBG-NSC» FNNS-2024-0004 (structural analysis and ploidy level investigation of the plant material) and FNNS-2022-0002 (*in vitro* cultivation), and on the base of the Unique scientific facilities «PHYTOBIOGEN».

Сведения об авторах

Булавин Илья Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9929-0946>

Корзина Наталья Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией морфогенеза и депонирования растений *in vitro* Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: natali.korz@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5220-5700>

Мирошниченко Наталья Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: natali_nbs88@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0009-0005-3650-4010>

Саплев Никита Максимович — науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: saplev.upk@ya.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1575-6639>

Солдатов Денис Константинович — инженер-исследователь лаборатории клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: den.alone.ru@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0009-0004-9856-5444>

Шевчук Оксана Михайловна — докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зам. директора по науке, зав. отделом технических культур и биологически активных веществ Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-00-98; e-mail: oksana_shevchuk1970@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3811-3161>

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 в 2023 г. составляет 0,892, показатель CiteScore 2023 (Scopus) англоязычной версии – 1,0.

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 подтверждают 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 – полуторный, 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). Объемы, 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, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение, 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

Список литературы оформляется в соответствии с форматом Vancouver. Указатель литературы к статьям формируется в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту. Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и пристатейного 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. *Название журнала* (принятый сокращенный вариант). Год;том(номер):страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (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: Название издательства (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;184(3):596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes. *PloS One*. 2020;15(4):e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённов А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости. *Комп. исслед. моделир.* 2020;12(6):1383–1395.

Книга:

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 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 and Protocols*, vol. 2094. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

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; 2013:174–176.

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: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК, аргинин – Арг, валин – Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов – обычным шрифтом. Например: ген – *FOXO3*, его продукт – FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно

пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвиговые 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 редколлегией на соответствие профилю и правилам оформления журнала. На первичное рассмотрение отводится 7–10 дней. Если в оформлении статьи обнаруживаются ошибки, ее рассмотрение занимает больше времени, так как редакторам необходимо составить список недочетов. Если работа совсем не соответствует требованиям, она возвращается авторам без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Рецензирование занимает от двух недель до месяца. Срок рецензирования включает в себя не только непосредственную работу рецензентов с рукописью, но и поиск подходящих специалистов (поиск может занять от двух дней до двух недель). 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 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Возможно несколько раундов рецензирования, если у рецензентов возникают новые замечания или они не согласны с исправлениями и ответами авторов. Далее над рукописью работают редакторы, исправленный текст и 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.

Важно: если авторы подают статью, написанную на английском языке в русскоязычную версию журнала, она публикуется только в этой версии и не публикуется в переводной версии (Moscow University Biological Science Bulletin). Для подачи статьи в переводную версию, необходимо воспользоваться системой сайта Pleiades Publishing (<https://www.pleiades.online/ru/journal/bbscimgu/>).

Полезные ссылки

Список сокращенных названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)