

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 80 • № 1 • 2025 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

- Кабиольский И.А., Панасенков П.Д., Лобода А.В., Потапов С.В.,
Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А. Влияние ингаляций аргоном
на поведение крыс в модели пренатальной алкогольной интоксикации 3
- Ловягина Е.Р., Локтюшкин А.В., Васильев Н.С., Семин Б.К.
Темновое химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего
участка фотосистемы 2 катионами Fe(II) 11
- Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Шестакова Е.А. Зависимость адаптации
штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 к высокой солености среды от стадии роста
и температуры 18
- Соловченко А.Е., Шурыгин Б.М., Селях И.О., Семенова Л.Р.,
Щербаков П.Н., Чивкунова О.Б., Лукьянов А.А., Михайлова Е.С.,
Крюк В.А., Лобакова Е.С. Гиперспектральный мониторинг влияния
средств защиты растений на состояние семян сосны обыкновенной
(*Pinus sylvestris* L.) при моделировании их ирригации карьерными
сточными водами 26
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А.
Корректирующее действие хитозана на параметры гемостаза
в условиях гипокоагуляции, вызванной антиагрегантом клопидогрелем 36

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 80 • No. 1 • 2025 • JANUARY — MARCH

Quarterly

Moscow University Press

CONTENTS

Research articles

- Kabiolskiy I.A., Panasenkov P.D., Loboda A.V., Potapov S.V., Sarycheva N.Y., Dubynin V.A. Behavioral effect of argon inhalations in a rat model of prenatal alcohol exposure 3
- Lovyagina E.R., Loktyushkin A.V., Vasiliev N.S., Semin B.K. Dark chemical blocking of the high-affinity Mn-binding site of photosystem II by Fe(II) cations. 11
- Anan'ina L.N., Gorbunov A.A., Shestakova E.A. Dependence of the adaptation of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32 to high salinity environment depending on growth stage and temperature. 18
- Solovchenko A.E., Shurygin B.M., Selyakh I.O., Semenova L.R., Scherbakov P.N., Chivkunova O.B., Lukyanov A.A., Mikhailova E.S., Kryuk V.A., Lobakova E.S. Hyperspectral monitoring of pesticide effects on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings irrigated with model coal mine wastewater 26
- Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A. The corrective effect of chitosan on hemostasis parameters under hypocoagulation conditions caused by the antiplatelet agent clopidogrel 36

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.021+57.023

Влияние ингаляций аргоном на поведение крыс в модели пренатальной алкогольной интоксикации

И.А. Кабиольский^{1, 2, *} , П.Д. Панасенков², А.В. Лобода², С.В. Потапов²,
Н.Ю. Сарычева¹, В.А. Дубынин¹

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

² ООО «ИнертГаз Медикал», Россия, 143005, г. Москва, ул. Нобеля, д. 7

*e-mail: ilyakab1999@gmail.com

Употребление алкоголя во время беременности способно нарушать развитие плода и повышает риск рождения ребенка с неврологическими и когнитивными нарушениями. В связи с этим поиск путей коррекции расстройств, вызванных пренатальным воздействием этанола, является актуальным. В настоящей работе проводится оценка влияния многократных ингаляций аргонсодержащей смесью (74% Ar, 21% O₂, 5% N₂) в сравнении с ингаляцией искусственным воздухом (79% N₂, 21% O₂) на поведение белых крыс в модели пренатальной алкогольной интоксикации. Ингаляции осуществляли в раннем постнатальном периоде с 6-х по 15-е сут жизни. У потомства, подвергнутого пренатальной алкогольной интоксикации, наблюдалось снижение качества вестибуло-спинальных рефлексов (6-е сут), а также подавление ориентировочно-исследовательского поведения, что было показано как в раннем постнатальном возрасте (4-е и 5-е сут), так и на более поздних сроках (21-е и 25-е сут). У пренатально алкоголизированных животных было отмечено усиление выраженности смещенной активности (реакции груминга). Пренатальное воздействие алкоголя привело к когнитивным нарушениям, которые отразились в ухудшении качества формирования пищедобывательного навыка в «сложном пищевом лабиринте». Ингаляции аргоном позволили скорректировать нарушения способности к обучению в данном тесте. Значимого влияния ингаляций аргонсодержащей смеси на другие параметры исследуемого поведения не было обнаружено.

Ключевые слова: аргон, пренатальная алкогольная интоксикация, поведение, двигательные рефлексы, обучение, крысы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-1

Введение

Известно, что инертный газ аргон вызывает ряд характерных физиологических эффектов. В работах, проводимых на культурах клеток и в моделях *in vivo*, показано, что аргон обладает нейропротективными и антиапоптотическими свойствами [1, 2]. Механизм действия аргона связан с ингибированием активности и снижением плотности рецепторов врожденного иммунитета – Toll-подобных рецепторов (TLR, Toll-like receptor) 2-го и 4-го типов, что приводит к увеличению количества фосфорилированной ERK 1/2-киназы и снижению содержания фосфорилированного NF-κB. В результате аргон уменьшает содержание белка BAX (Bcl-2-associated X protein, Bcl-2-ассоциированный X-белок), ускоряющего запрограммированную гибель клеток, и напротив, увеличивает содержание ингибитора

апоптоза Bcl-2, что приводит к увеличению выживаемости нейронов [3].

Нарушение активности системы врожденного иммунитета, которое может провоцировать избыточную гибель нейронов, характерно для некоторых психоэмоциональных расстройств. Такие изменения типичны и для фетального алкогольного спектра нарушений (ФАСН). Известно, что пренатальная алкоголизация плода может приводить к повышению экспрессии белков передачи внутриклеточных путей TLR-сигналикации, включая TLR-3 и TLR-4, адаптерные белки, а также провоспалительные цитокины [4]. Воздействие алкоголя на развивающуюся нервную систему в пренатальном периоде приводит к переключению микроглии на провоспалительный фенотип и увеличению экспрессии провоспалительных цитоки-

нов у потомства; отмечено также снижение дофаминергических проекций в неокортексе [5]. Кроме того, известно, что нейровоспаление, вызванное действием алкоголя через TLR-2 и TLR-4, приводит к когнитивным нарушениям и увеличению тревожности у животных [6, 7].

Поскольку из литературных данных следует, что некоторые мишени действия аргона и алкоголя совпадают, причем направленность действия этих химических факторов противоположна, нами было выдвинуто предположение о возможности применения аргона с целью коррекции последствий пренатального воздействия алкоголя.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Исследования выполнены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа проводилась на потомстве крыс (N = 74) от 8 самок стока Wistar, поступивших из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария с доступом к пище и воде *ad libitum*, за исключением тестов, включающих период обучения на фоне пищевой депривации. Длительность светового дня составляла 12 ч (8:00–20:00). День рождения крыс принимали за нулевой день жизни (0 ПНС: «ПНС» — постнатальные сутки).

Моделирование пренатальной алкогольной интоксикации. После спаривания самок переселяли в отдельные клетки. При отсадке половине из них предоставляли в качестве единственного источника жидкости 10%-ный раствор этанола на весь срок беременности и на 1–6-е сут после рождения потомства. Другая половина самок получала как источник питья обычную воду.

Методика ингаляций. Ингаляционная установка представляет собой полипропиленовый герметичный контейнер, присоединенный к газопроводному контуру. Контур включает в себя датчики концентрации кислорода и аргона, камеру с абсорбером углекислого газа Sodasorb (GCP Applied Technologies Inc., Россия), а также двумя дыхательными резервными мешками и однонаправленными клапанами. Последние позволяли прокачивать газовую смесь вручную в одном направлении, создавая газовый поток по циклу через датчики, абсорбер углекислого газа и контейнер с экспериментальными животными. Газовая смесь создается путем подключения потока со скоростью 4 л/мин целевого газа (Ar — опыт, N₂ — вещество сравнения) и 1 л/мин кислорода, которые постепенно замещают изначальную газовую среду внутри ингаляционной установки. Датчик кислорода позволяет исследователю избегать создания ситуации гипоксии и вручную добавлять кислород в контур для достижения нужной концентрации. Концентрация кислорода отслежива-

ется и поддерживается на уровне $21 \pm 1\%$. Ингаляции крыс проводились ежедневно с 6 ПНС по 15 ПНС включительно.

6 ПНС соответствует примерно 30–33 нед. беременности (II степени недоношенности) у человека [8]. Рождение недоношенных детей в свою очередь является частым событием при злоупотреблении алкоголя беременными [9].

Продолжительность ингаляции в наших экспериментах составляла 50 мин, время засекалось с момента достижения нужной концентрации аргона либо через 5 мин после продувания контура азот-кислородной смесью. Потомство здоровых и алкоголизованных самок разделили пополам на группы, ингаляции которым проводились либо азот-кислородной смесью (79% N₂, 21% O₂) либо аргон-кислородной (74% Ar, 21% O₂, 5% N₂) смесью, в которой всегда находились остаточные количества азота ввиду того, что процесс приготовления газовой смеси осуществлялся вручную. Во время ингаляции под контейнер помещали нагревательный элемент с термостатом (37°C у дна контейнера), чтобы избежать нарушения терморегуляции детенышей. Длительность всей процедуры, включая процесс получения смеси с нужными концентрациями, не превышала 1 ч.

Поведенческие тесты в раннем постнатальном периоде. Сроки для проведения тестов в раннем постнатальном периоде были выбраны согласно данным о периоде развития локомоторных рефлексов у крыс [10]. С 4-х по 6-е ПНС в течение 180 с у потомства оценивали уровень локомоторной и ориентировочной активности. Регистрировали следующие параметры: количество поворотов головы (отклонение головы от линии тела на 45° и более), продолжительность поворотов головы, количество поворотов корпуса (акт перемещения тела на произвольный угол при помощи отталкивания передними лапами), общее количество двигательных актов.

Также ежедневно с 4-х по 6-е ПНС включительно тестировался рефлекс переворота со спины (righting reflex). Детеныша клали на спину и засекали время, за которое он перевернется на все четыре лапы. Максимальное время регистрации составляло 60 с.

Тест «Открытое поле» (ОП). Тест в установке «Открытое поле» (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) проводили на 21-е ПНС. Установка представляет собой круглую пластиковую арену (диаметр 63 см, высота стенок 32 см). Красная (15 Вт) лампа находится на высоте 80 см от центра арены. Пол арены расчерчен двумя концентрическими окружностями, находящимися на равном расстоянии (10 см) друг от друга и от края арены, разделяя всю арену на периферическую часть, внутреннее кольцо и центральный круг. Также пол арены разделен радиальными отрезками прямых, делящими поле на 19 равных по площади сегментов. В ходе

опыта животное помещают в центр арены и в течение 5 мин осуществляют видеосъемку. Оценивали число стоек с опорой и без опоры, сумму пройденных секторов и радиальных перемещений от периферии к центру и обратно (отходы от стенки арены, выходы в центр арены); количество коротких актов груминга (умывания), а также продолжительность груминга, происходящего длительное время; число актов дефекации; время, проведенное на периферии и в центре арены; латентный период первого подхода к стенке арены.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Тест в установке «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) проводили на 25-е ПНС. Лабиринт представляет собой пластмассовый горизонтальный равносторонний крест (длина лучей 50 см, ширина 15 см), два противоположных рукава которого имеют боковые и торцевые стенки высотой 30 см. Два других рукава открыты. Открытые рукава размечены: один отрезок отделяет светлый рукав от центрального квадрата, второй делит длину рукава пополам. Открытые рукава освещаются яркими лампами (60 Вт), находящимися на расстоянии 25–30 см от конца каждого рукава. Животное в начале опыта помещали в центр лабиринта головой в сторону света. Тестирование продолжалось 5 мин с осуществлением видеосъемки. Отмечали число стоек на свету, в темноте и в центре; продолжительность груминга; число выглядываний из темного отсека; число пересечений внутренней границы освещенного рукава; число пересечений наружной границы освещенного рукава (выходы на край рукава); число свешиваний со светлого рукава; число свешиваний с края светлого рукава; число свешиваний из темного рукава (задние лапы животного при свешивании остаются в темном рукаве); суммарное время, проведенное на свету, в темноте, в центре; латентный период входа в темный отсек.

Тест «Сложный пищевой лабиринт» (СПЛ). Установка представляет собой квадратную камеру, разделенную пятью прозрачными перегородками на 6 коридоров. В каждой перегородке в центре, справа либо слева имеется прямоугольное отверстие. В первый день эксперимента крыс помещали в лабиринт на 30 мин с целью адаптации. При этом по всей площади лабиринта раскладывали большое количество корма (шариков из хлеба). После этого животных подвергали 24-часовой пищевой депривации. В последующие 4 дня крыс помещали в лабиринт по 5 раз подряд ежедневно, длительность каждой посадки не превышала 3 мин. Животное помещалось в стартовый угол лабиринта, а пищевое подкрепление — в наиболее удаленный противоположный угол. Регистрировали следующие показатели: число выполненных реакций (число случаев, когда животное находит пищевое подкрепление в течение 3 мин пребыва-

ния в лабиринте); количество ошибок (число любых отклонений от оптимальной траектории движения); время выполнения реакции; количество вертикальных стоек; количество актов груминга.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ данных производили с помощью пакета программ GraphPad Prism 8.2.0. (GraphPad Software, США). Для оценки исследуемых параметров применяли трехфакторный дисперсионный анализ (Three-way ANOVA). Оценивали вклад следующих факторов: «Модель» — фактор моделирования пренатального алкогольного воздействия («Контроль» vs «ПА» — пренатальная алкоголизация), «Газ» — фактор используемой газовой смеси («Азот» vs «Аргон»), «Пол» — половые различия. В качестве post hoc-анализа применяли критерий Шидака для поправки на множественную проверку гипотез. По результатам обработки первичных данных не было обнаружено влияния фактора «Пол» и его взаимодействия с другими факторами. С учетом этого мы производили консолидацию выборки, объединяя самцов и самок из одной подгруппы, применяя затем для оценки различий двухфакторный дисперсионный анализ (Two-way ANOVA). При анализе результатов тестов в раннем постнатальном периоде дополнительно анализировали фактор «Сутки проведения теста». При отсутствии взаимодействия этого фактора с фактором «Модель» проводили оценку результатов в отдельные дни тестирования с помощью критерия Манна-Уитни для выборок, не соответствующих нормальному распределению (тест Шапиро-Уилка). Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние пренатальной алкогольной интоксикации на параметры ориентировочного рефлекса и рефлекса переворота со спины. В раннем постнатальном периоде (с 4-х по 6-е ПНС) была произведена оценка влияния пренатальной алкогольной интоксикации на реализацию рефлексов поворота головы и переворота со спины (рис. 1). Пренатальная алкоголизация не привела к статистически значимому ($p = 0,0501$; $F(1, 72) = 3,971$, фактор «Контроль»/«ПА») снижению времени, проводимому в состоянии ориентировочного вращения головой, на протяжении 4-х, 5-х и 6-х сут тестирования (рис. 1А). Однако, если исключить из расчета 6-е сутки тестирования, различия между группами становятся статистически значимыми ($p = 0,0457$; $F(1, 72) = 4,133$, фактор «Контроль»/«ПА»). Это позволяет сделать вывод о том, что пренатальная алкогольная интоксикация подавляет проявления ориентировочных рефлексов на раннем этапе постнатального онтогенеза. К 6-ым ПНС ее влияние на соответствующие реакции слабеет.

При оценке времени реакции переворота со спины с учетом всех 3-х сут исследования стати-

стически значимого влияния фактора «Модель» не выявлено (рис. 1Б). Однако рассмотрение только 6-х ПНС позволяет обнаружить эффект пренатального воздействия алкоголя. Потомство опытной группы выполняет реакцию переворота значительно медленнее ($p = 0,0065$; критерий Манна-Уитни), что позволяет говорить о некотором угнетении вестибуло-спинальных рефлексов у потомства, подвергнутого алкогольной интоксикации.

Оценка отставленного эффекта влияния ингаляций аргоном на локомоторную и ориентировочно-исследовательскую активность в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». В тесте «ОП» животные, подвергшиеся пренатальной алкогольной интоксикации, совершали меньше стоек с опорой ($p = 0,0188$; $F(1, 66) = 5,805$, фактор «Модель»; рис. 2А); кроме того, у них увеличена суммарная продолжительность груминга ($p = 0,0092$; $F(1, 66) = 7,195$; рис. 2Б).

В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» пренатально алкоголизованные животные проводили меньше времени в темном отсеке лабиринта и больше в центральной части (рис. 2В, 2Г), при этом время, проведенное на освещенных участках лабиринта, не различалось у групп «Контроль» и «ПА». У пренатально алкоголизованных животных снижалось количество стоек без опоры внутри темного отсека ($p = 0,0284$; $F(1, 67) = 5,015$, фактор «Модель»; рис. 2Д).

В данных тестах статистически значимых влияний ингаляций на поведение не обнаружено.

Оценка отставленных влияний ингаляций аргоном на способность животных к формированию сложного пищедобывательного навыка. У контрольных животных, подвергавшихся ингаляциям как азот-кислородной, так и аргон-кислородной сме-

сями, произошло значимое снижение количества ошибок к последнему дню обучения по сравнению с первым (рис. 3А, слева). У пренатально алкоголизованных животных количество ошибок, совершаемых на 4-е сут обучения, не было значимо снижено по сравнению с 1-ми сут ($p = 0,5511$, критерий Шидака; рис. 3А). При этом число выполненных реакций в группах не различалось. Эффект алкоголизации в отношении количества ошибок компенсировался ингаляцией аргон-кислородной смесью (рис. 3А, справа).

Животные, получавшие ингаляции аргоном, как контрольные, так и алкоголизованные, достигали пищевого подкрепления быстрее животных, дышавших азот-кислородной смесью (рис. 3Б). Кроме того, у них было значимо снижено число стоек (рис. 3В).

Обсуждение

Известно, что нарушение контроля двигательных реакций характерно для детей с фетальным алкогольным синдромом [11]. Согласно полученным нами результатам, пренатальная алкоголизация оказала влияние как на ориентировочную активность (4-е и 5-е ПНС), так и в некоторой степени на время выполнения вестибуломоторной реакции (только 6-е ПНС). Мы предполагаем, что различия между двумя группами могли быть отчасти нивелированы регулярным проведением тестирований, при которых потомство изымали от матери. Неонатальный хэндлинг и отделение от матери могут приводить как к положительным, так и к негативным изменениям в развитии потомства [12]. В связи с этим воздействие процедур тестирования могло сказаться на относительно небольшой выраженности эффектов пренатальной алкоголизации.

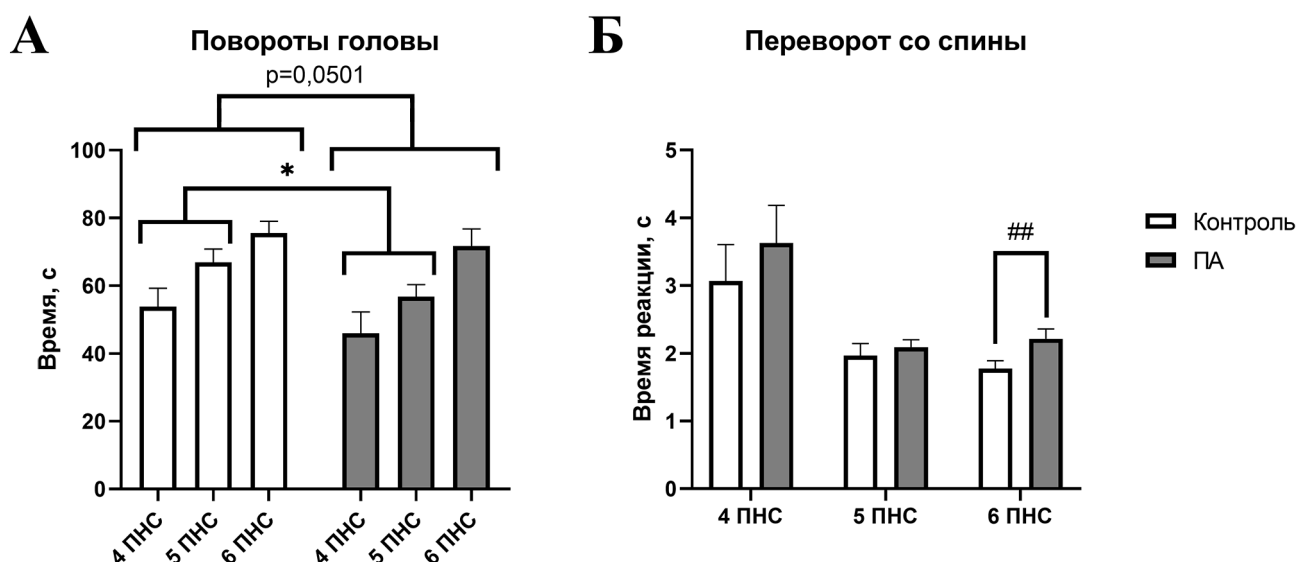


Рис. 1. Результаты тестирования активности рефлексов в раннем постнатальном периоде. Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. «Контроль» — животные без пренатального воздействия ($N = 40$), «ПА» — пренатально алкоголизованные животные ($N = 34$), «ПНС» — постнатальные сут. **А.** Суммарное время, потраченное на повороты головы; **Б.** Время переворота со спины на лапы. Статистическая значимость влияний факторов или межгрупповых различий по результатам двухфакторного анализа: * — $p < 0,05$; статистически значимые различия по результатам критерия Манна-Уитни: ## — $p < 0,01$.

В нашей работе показано явное снижение количества стоек у пренатально алкоголизированных крыс в «ОП». Это согласуется с данными Груздевой с соавт., использовавшими более тяжелое воздействие, чем в нашей модели (применяли 15%-ный раствор этанола в течение всего срока беременности) [13]. Также нами отмечено изменение продолжительности реакций груминга – смещенной активности, которая характерна для ситуаций отсутствия готовых паттернов поведения в новых условиях. В литературе описано функциональное различие между короткими стереотипич-

ными актами груминга, коррелирующими с повышенной тревожностью, и более естественными продолжительными актами груминга, характерными для спокойного состояния грызунов [14]. В нашей работе продолжительность актов груминга в опытной группе значимо увеличилась.

Известно, что пренатальное воздействие алкоголя обычно приводит к повышению тревожности у крыс [13]. В нашей экспериментальной серии такой эффект не был показан; мы наблюдали снижение времени, проводимого в темном отсеке «ПКЛ». Это, с одной стороны, свидетельствует о снижении

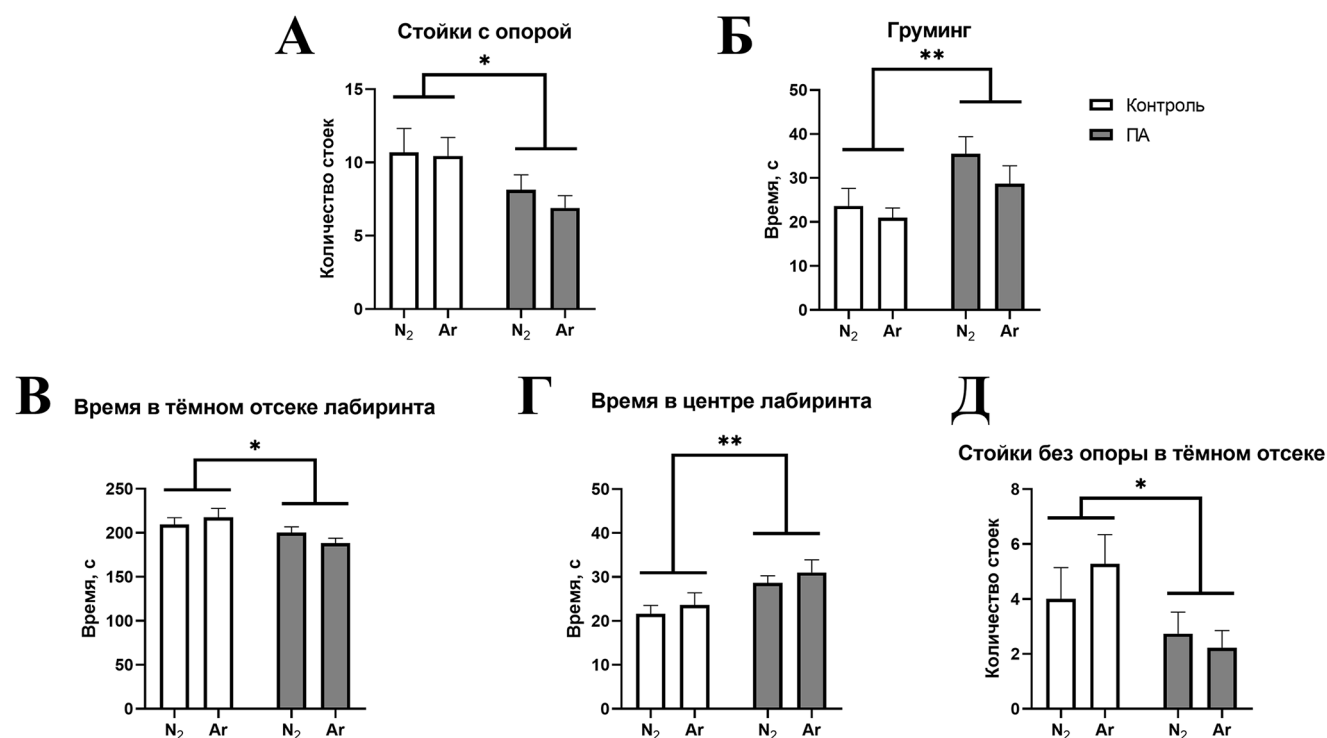


Рис. 2. Параметры поведения в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт». А. Количество стоек с опорой в «Открытом поле»; Б. Продолжительность груминга в «Открытом поле»; В. Время, проведенное в темном отсеке лабиринта; Г. Время, проведенное в центральной части лабиринта; Д. Количество стоек без опоры в темном отсеке лабиринта. Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. «Контроль» – животные без пренатального воздействия, «ПА» – пренатально алкоголизированные животные. N(Контроль + N₂) = 20/19 (11♂ + 9♀ – «ПКЛ» / 8♀ – «ОП», один выброс); N(Контроль + Ar) = 18 (9♂ + 9♀); N(ПА + N₂) = 15 (6♂ + 9♀); N(ПА + Ar) = 18 (8♂ + 10♀). Статистическая значимость влияний факторов или межгрупповых различий: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

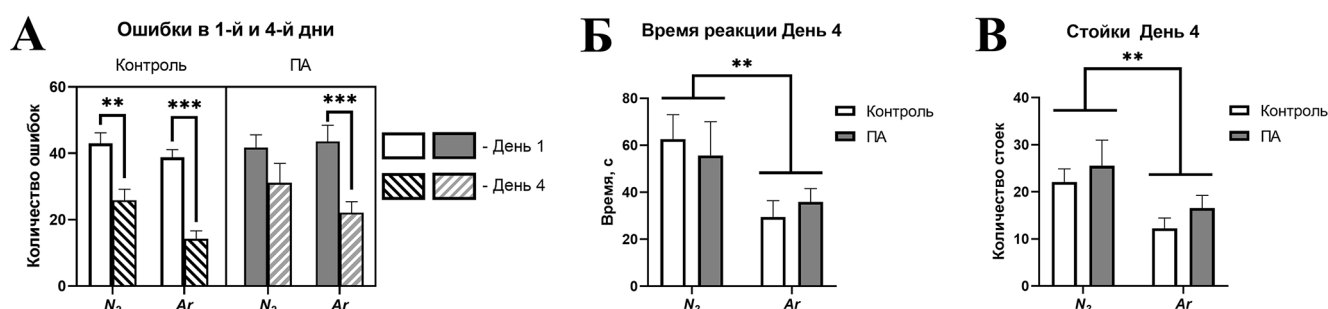


Рис. 3. Результаты тестирования в установке «Сложный пищевой лабиринт». А. Сравнение количества ошибок в первый и последний дни тестирования в разных экспериментальных группах; Б. Время, за которое животные достигали пищевого подкрепления, на четвертый день тестирования; В. Количество стоек в лабиринте на четвертый день тестирования. Данные представлены в виде среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего. «Контроль» – животные без пренатального воздействия, «ПА» – пренатально алкоголизированные животные. N(Контроль + N₂) = 19 (11♂ + 8♀); N(Контроль + Ar) = 18 (9♂ + 9♀); N(ПА + N₂) = 15 (6♂ + 9♀); N(ПА + Ar) = 18 (8♂ + 10♀). Статистическая значимость влияний факторов или межгрупповых различий: * – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

тревожности животных. С другой стороны, экспериментальные группы не различались по времени, проведенному на светлых рукавах лабиринта. Кроме того, у пренатально алкоголизированных животных было показано снижение количества вертикальных стоек без опоры внутри темного отсека, что является признаком подавленной ориентировочно-исследовательской активности. Таким образом, в нашей серии опытов пренатальная алкоголизация не привела к росту тревожности, но увеличила эмоциональную ригидность (упомянутое выше усиление груминга) и снизила активность исследовательского поведения.

В тесте «СПЛ» пренатальная алкоголизация привела к тому, что количество ошибок не снижалось при сравнении 1-х и 4-х сут обучения. Ингаляции аргоном делали такое снижение достоверным, как и в контрольных подгруппах.

Интересно, что при этом аргон воздействовал на время реакции и количество стоек вне зависимости от фактора «Модель»: после серии ингаляций в раннем постнатальном периоде животные быстрее находили подкрепление и совершали меньше стоек в четвертый день обучения. Стойки в данном тесте являются показателем менее качественного формирования навыка. Животные используют стойки для поиска внешних ориентиров за границами лабиринта для определения правильного маршрута до пищевого подкрепления. Таким образом, у крыс, которые в раннем постнатальном периоде с 6-х по 15-е ПНС подвергались воздействию аргона, оказались улучшены способности к формированию пищедобывательного навыка, в том числе в случае пренатальной алкоголизации.

Заключение

Полученные в нашем исследовании данные демонстрируют эффекты влияния пренатальной алкоголизации (ПА) на поведение крыс. Результаты оценки развития вестибуло-моторных и ориентировочных реакций в раннем онтогенезе согласуются с клиническими данными [15]. У детей с фетальным алкогольным синдромом (ФАС) не-

редко наблюдаются нарушения баланса и координации движений. При этом, в отличие от ряда предыдущих исследований, мы не выявили однозначного изменения эмоционального статуса у животных с ПА: несмотря на высокую выраженность смещенной активности (груминг), они не проявляли признаков увеличения тревожности. Полученные результаты позволяют сделать вывод об угнетении ориентировочно-исследовательской активности (тесты «ОП» и «ПКЛ») и способности к обучению (тест «СПЛ») у ПА животных, что согласуется с литературными данными.

Нами впервые обнаружено позитивное действие ингаляций аргонсодержащей смесью на способность белых крыс к обучению. Предшествующие исследования аргона *in vivo* в основном акцентировали внимание на неврологических проявлениях как части широкого спектра поведенческих реакций. Также нейропротективные свойства аргона *in vivo* ранее не были показаны на моделях пренатального повреждающего воздействия. В нашем исследовании аргон в некоторой степени корректировал нарушенную способность к обучению у животных, подвергнутых пренатальной алкогольной интоксикации. Таким образом, аргон можно рассматривать в качестве средства терапии расстройств, обусловленных пренатально вызванными дисфункциями центральной нервной системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ИнертГаз Медикал» в рамках договора №1-20/05 от 10.02.2020 о научно-практическом сотрудничестве между биологическим факультетом МГУ имени М.В. Ломоносова и ООО «ИнертГаз Медикал». Все эксперименты были проведены в соответствии с международными биоэтическими нормами (Директива Европейского Сообщества от 24 ноября 1986 г. — 86/609/ЕЕС) и одобрены комиссией Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по биоэтике (протокол № 107-д, 19.02.2019). Раскрытие конфликта интересов: авторы И.А.К., П.Д.П., А.В.Л и С.В.П. получают заработную плату в ООО «ИнертГаз Медикал».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loetscher P.D., Rossaint J., Rossaint R., Weis J., Fries M., Fahlenkamp A., Ryang Y.M., Grottke O., Coburn M. Argon: neuroprotection in *in vitro* models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Crit care*. 2009;13(6):R206.
2. Ryang Y.M., Fahlenkamp A.V., Rossaint R., Wesp D., Loetscher P.D., Beyer C., Coburn M. Neuroprotective effects of argon in an *in vivo* model of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Crit. Care Med*. 2011;39(6):1448–1453.
3. Scheid S., Lejarre A., Wollborn J., Buerkle H., Gobel U., Ulbrich F. Argon preconditioning protects neuronal cells with a Toll-like receptor-mediated effect. *Neural Regen. Res*. 2023;18(6):1371–1377.
4. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Игнатова П.Д., Скабелкин Д.А., Михайлова А.А., Ганьшина Д.А., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Влияние рифампицина на экспрессию генов системы toll-подобных рецепторов в коре переднего отдела мозга крыс с пренатальным воздействием алкоголя. *Биомедицинская химия*. 2023;69(4):228–234.
5. Komada M., Hara N., Kawachi S., Kawachi K., Kagawa N., Nagao T., Ikeda Y. Mechanisms underlying neuro-inflammation and neurodevelopmental toxicity in the mouse neocortex following prenatal exposure to ethanol. *Sci. Rep*. 2017;7(1):4934.

6. Montesinos J., Pascual M., Pla A., Maldonado C., Rodríguez-Arias M., Miñarro J., Guerri C. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav. Immun.* 2015;45:233–244.
7. Pascual M., Balaño P., Aragón C.M., Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology.* 2015;89:352–359.
8. Суханова Ю.А., Себенцова Е.А., Левицкая Н.Г. Острые и отсроченные эффекты перинатального гипоксического повреждения мозга у детей и в модельных экспериментах на грызунах. *Нейрохимия.* 2016;33(4):276–292.
9. Легонькова С.В., Пальчик А.Б., Софронова Г.И. Фетальный алкогольный синдром: клинические, нейрофизиологические, возрастные и этнические аспекты. *Наука о жизни и здоровье.* 2010;(1):51–53.
10. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 1975;23(4):896–920.
11. Chung D.D. Pinson M.R., Bhenderu L.S., Lai M.S., Patel R.A., Miranda R.C. Toxic and teratogenic effects of prenatal alcohol exposure on fetal development, adolescence, and adulthood. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(16):8785.
12. Балакина М.Е., Дегтярева Е.В., Некрасов М.С., Брус Т.В., Пюрвеев С.С. Воздействие раннего постнатального стресса на психоэмоциональное состояние и развитие склонности к чрезмерному употреблению высокоуглеводной пищи у крыс. *Российские биомедицинские исследования.* 2021;6(2):27–37.
13. Груздева Т.С., Инюшкин А.Н. Влияние воздействия алкоголем в пренатальном периоде на поведение крыс. [Электронный ресурс]. 2021. URL: <http://repo.ssau.ru/handle/Aktualnye-voprosy-sovremennoi-nauki/Vliyanie-vozdeistviya-alkogolem-v-prenatalnom-periodena-povedenie-krys-Tekst-elektronnyi-87805> (дата обращения: 16.03.2023).
14. Ясенявская А.Л., Сергалиева М.У., Сомотруева М.А., Мажитова М.В. Экспериментальное подтверждение формирования состояния повышенной тревожности в условиях информационного воздействия. *Астраханский медицинский журнал.* 2016;11(2):92–98.
15. Church M.W., Abel E.L. Fetal alcohol syndrome: Hearing, speech, language, and vestibular disorders. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 1998;25(1):85–97.

Поступила в редакцию 14.07.2024

После доработки 25.02.2025

Принята в печать 26.03.2025

RESEARCH ARTICLE

Behavioral effect of argon inhalations in a rat model of prenatal alcohol exposure

I.A. Kabiolskiy^{1, 2, *} , P.D. Panasenkov², A.V. Loboda², S.V. Potapov²,
N.Y. Sarycheva¹, V.A. Dubynin¹

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

² LLC “InertGas Medical,” 7 Nobelya Street, Moscow, 143005, Russia

*e-mail: ilyakab1999@gmail.com

Alcohol consumption during pregnancy can disrupt fetal development and increases the risk of having a child with neurological and cognitive impairments. In this regard, finding ways to correct disorders caused by prenatal exposure to ethanol is relevant. In this study, we assessed the acute and delayed effects of repeated inhalations of an argon-containing mixture (74% Ar, 21% O₂, 5% N₂) in comparison with artificial air (79% N₂, 21% O₂) on the behavior of white rats in a model of prenatal alcohol intoxication. Inhalations were carried out in the early postnatal period from 6 to 15 postnatal days. In offspring exposed to prenatal alcohol intoxication, there was a decrease in the quality of development of vestibulo-motor reflexes (6th postnatal day), as well as suppression of orienting-exploratory behavior, which was shown both at early postnatal age (in 4th and 5th postnatal days), and at later stages (21st, 25th postnatal days). In prenatally alcoholized animals, an increase in the rigidity and repetitiveness of behavior in the form of grooming was noted. Prenatal exposure to alcohol led to cognitive impairment, which was reflected in a deterioration in the quality of formation of food acquisition skills in the “complex food maze.” In turn, argon inhalation made it possible to correct learning disabilities in this test. The effect of inhalation of an argon-containing mixture on other parameters of the studied behavior was not found.

Keywords: argon, prenatal alcohol intoxication, behavior, motor reflexes, learning, rats

Funding: The work was carried out with the financial support of LLC “InertGas Medical” within the framework of agreement No. 1-20/05 dated February 10, 2020 on scientific and practical cooperation between the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University and LLC InertGas Medical.

Сведения об авторах

Кабиольский Илья Алексеевич — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: ilyakab1999@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-2924-5851>

Панасенков Павел Дмитриевич — инженер-конструктор отдела производства медицинской техники ООО «ИнертГаз Медикал». Тел.: 8-495-123-45-91, e-mail: info@ingasgroup.ru

Лобода Антон Васильевич — врач-анестезиолог и реаниматолог, врач общей практики, медицинский директор ООО «ИнертГаз Медикал». Тел.: 8-495-123-45-91, e-mail: info@ingasgroup.ru

Потапов Сергей Владимирович — канд. техн. наук, генеральный директор ООО «ИнертГаз Медикал». Тел.: 8-495-123-45-91, e-mail: s.potapov@ingasgroup.ru

Сарычева Наталия Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: nsarycheva.bio@yandex.ru

Дубынин Вячеслав Альбертович — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-28-95; e-mail: dva-msu@yandex.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.355.2

Темновое химическое блокирование высокоаффинного Мп-связывающего участка фотосистемы 2 катионами Fe(II)

Е.Р. Ловягина* , А.В. Локтюшкин , Н.С. Васильев , Б.К. Семин

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

*e-mail: elena.lovayagina@gmail.com

Связывание катиона Fe(II) с высокоаффинным Мп-связывающим участком (ВАУ) фотосистемы 2 без кислород-выделяющего комплекса (ФС2(-Mn)) состоит из нескольких этапов — высоко-специфическая ассоциация катиона Fe(II) с ВАУ, окисление связанного катиона радикалом тирозина $Y_Z^{\bullet}$, генерируемым в результате поглощения кванта света первичным донором P680 и разделения зарядов в реакционном центре, прочное связывание катиона Fe(III) с ВАУ, что приводит к блокированию (фотохимическому) ВАУ. В настоящей работе мы показали, что блокирование ВАУ катионом Fe может быть достигнуто не только фотохимическим способом, но и химическим: слабо связанный с ВАУ катион Fe(II) может быть окислен H_2O_2 , что приводит к образованию Fe(III) и блокированию им ВАУ в результате прочного связывания. Однако эффективность химического блокирования существенно меньше фотохимического. Этот факт свидетельствует о том, что фотохимическое блокирование является не одноквантовым, а, по крайней мере, двухквантовым процессом. Полученные данные свидетельствуют в пользу двухквантового механизма физиологически очень важного процесса — фотоактивации (реконструкция марганцевого кластера в частицах ФС2(-Mn) в процессе их инкубации при освещении с катионами Mn(II)).

Ключевые слова: фотосистема 2, фотоактивация, кислород-выделяющий комплекс, марганец-связывающий участок, железо, пероксид водорода

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-2

Введение

Процесс взаимодействия катионов Mn(II) с фотосистемой 2 (ФС2) без кислород-выделяющего комплекса (КВК) представляет значительный интерес и интенсивно изучается. Причиной этого является высокая интенсивность фотоингибирования ФС2, в результате которого с большой скоростью разрушается полипептид D1 — основной Мп-связывающий компонент КВК (время полураспада 2,4 ч в листьях ячменя [1]). Поэтому в окисленных организмах постоянно идет процесс реконструкции марганцевого кластера. Механизм этого процесса интенсивно исследуется *in vitro* [2]. Установлено, что на первоначальном этапе катионы Mn(II) специфически, но слабо связываются с высокоаффинным Мп-связывающим участком (ВАУ) ФС2 без марганца (ФС2(-Mn)), после чего окисляются радикалом тирозина $Y_Z^{\bullet}$, генерируемым в результате поглощения кванта света первичным донором P680 и разделения зарядов в реакционном центре.

В результате этого процесса происходит связывание окисленного катиона Mn с ВАУ. Далее поглощение второго кванта света через определенный темновой интервал сопровождается связыванием второго катиона и образованием димера. Следует отметить, что ВАУ может связывать также катионы Fe(II) с эффективностью, сопоставимой с эффективностью связывания катионов Mn(II) [3–4], причем с такой же последовательностью этапов [5]. Необходимым условием связывания катионов Fe(II) с ВАУ (так же, как и катионов Mn(II)) является наличие света. Свет обеспечивает разделение зарядов в реакционном центре ФС2(-Mn) и генерацию окислителя — тирозина $Y_Z^{\bullet}$, окисляющего ассоциированный с ВАУ катион Fe(II). Образующийся катион Fe(III) прочно связывается с ВАУ и препятствует связыванию с этим участком экзогенных катионов Mn(II) (блокирование ВАУ). В темноте блокирование ВАУ катионами Fe(II) не происходит.

Аналогичное развитие событий имеет место и при другом способе связывания катионов Fe с Mn-связывающими участками, при котором Fe(II)-катион замещает один или два катиона Mn в KBK [6–7]. Замещение возможно в препаратах ФС2 без Ca(II) в KBK. Следует отметить, что в процессе экстракции Ca(II) удаляются и два периферических белка PsbQ и PsbP. Потеря этих белков открывает доступ катионов Fe(II) к катионам Mn, в результате чего происходит взаимодействие катионов металлов между собой: окисленный катион Mn является очень сильным окислителем и окисляет катион Fe(II) (редокс-потенциал около 0 мВ в нейтральной среде [8]). Восстановленный катион Mn(II) покидает участок связывания, а его место занимает катион Fe(III). Процесс замещения происходит в темноте. Таким образом, эти два примера показывают, что для связывания катионов Fe с Mn-связывающим участком необходимы не только катионы Fe(II), но и агент, способный их окислять.

Учитывая эти факты, мы исследовали возможность связывания катионов Fe(II) с ВАУ ФС2(-Mn) в присутствии сильного окислителя — H_2O_2 , эффективно реагирующего с катионами Fe(II), окисляя их (реакция Фентона).

Материалы и методы

Препараты ФС2 ВВУ-типа были выделены из свежих листьев рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. согласно опубликованной ранее методике [9]. Полученные препараты хранили при -80°C в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу, 50 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (Mes), pH 6,5. Удаление белков KBK и катионов марганцевого кластера проводили путем обработки препаратов ФС2 при концентрации хлорофилла (Хл) $0,5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ 0,8 М буфером Tris-HCl (pH 8,5) в течение 15 мин при комнатном освещении ($4\text{--}5 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и комнатной температуре (22°C). Затем препараты центрифугировали в течение 3 мин при 16100 g, дважды переосаждали в буфере А и хранили при -80°C при концентрации $1 \text{ мг Хл} \cdot \text{мл}^{-1}$. Помимо катионов Mn, полученные таким образом препараты (ФС2(-Mn)) не содержали катиона Ca(II), а также внешних белков PsbQ, PsbP и PsbO, которые в нативной ФС2 препятствуют доступу экзогенных восстановителей к донорной стороне. Суммарную концентрацию хлорофилла определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно описанному ранее методу [10]. Перед измерениями препараты размораживали в темноте в холодильнике в течение часа.

Скорость фотовосстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндифенола (ДХФИФ) как критерий активности электронного транспорта в препаратах ФС2 измеряли на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кюветах с длиной оптического пути

1 см. В качестве источника возбуждающего света, обеспечивающего насыщающую интенсивность $1800 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, использовали светодиоды XBDROY (Cree Inc., США) с максимумом излучения 450 нм. Для отсекающего возбуждающего света перед фотоэлектронным умножителем спектрофотометра устанавливали оранжевый светофильтр ОС-14. Фотоиндуцированные изменения оптической плотности ДХФИФ регистрировали при длине волны 600 нм. Для расчета скорости восстановления ДХФИФ использовали коэффициент экстинкции для его депротонированной формы $\epsilon = 21,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [11]. Концентрация ФС2 во всех измерениях составляла $10 \text{ мкг Хл} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe проводили следующим образом. Препараты ФС2(-Mn) ($50 \text{ мкг Хл} \cdot \text{мл}^{-1}$) инкубировали с 10 мкМ FeSO_4 в темноте при 4°C в течение 0,5 мин. Затем добавляли 3 мМ H_2O_2 , инкубировали при тех же условиях еще 1 мин, центрифугировали при 16100g 4 мин и ресуспендировали в буфере А ($10 \text{ мкг Хл} \cdot \text{мл}^{-1}$ в случае однократной обработки и $50 \text{ мкг Хл} \cdot \text{мл}^{-1}$ — в случае повторной). Повторную обработку препаратов проводили через 1 мин идентичным первой способом.

Представленные на рисунках и в таблице данные являются средними арифметическими значений, полученных в независимых экспериментах при не менее 3 измерениях в каждом опыте.

Результаты и обсуждение

Мембранные препараты ФС2 без Mn имеют один участок, связывающий катионы Mn(II) с высокой эффективностью (константа диссоциации 1 мкМ) [12]. Ранее мы обнаружили, что катионы Fe(II) также связываются с ВАУ с эффективностью, сопоставимой с таковой для катионов Mn(II) (50%-е связывание имеет место в области $\approx 1 \text{ мкМ}$) [3]. Для необратимого прочного связывания необходим свет (достаточно слабого комнатного освещения), т.е. необходимо окисление ассоциированных с ВАУ катионов Fe(II) тирозином $\text{Y}_Z^{\bullet}$. Связанный катион Fe(III) блокирует ВАУ, препятствуя взаимодействию катионов Mn(II) с этим участком [4]. На рис. 1А показана концентрационная зависимость блокирования ВАУ катионами Fe(II) при фотохимическом окислении катионов Fe(II) (комнатное освещение 3 мин). Эффективность блокирования резко увеличивается с увеличением концентрации катионов Fe(II) примерно до $\approx 2,5 \text{ мкМ}$, после чего достигает плато на уровне 10% электрон-транспортной активности, оцененной по скорости восстановления акцептора электронов ДХФИФ (рис. 1А). На врезке рис. 1А представлены кинетические кривые восстановления экзогенного акцептора электронов ДХФИФ контрольным препаратом ФС2(-Mn) (1) и препаратам ФС2(-Mn) после обработки катионами Fe(II)

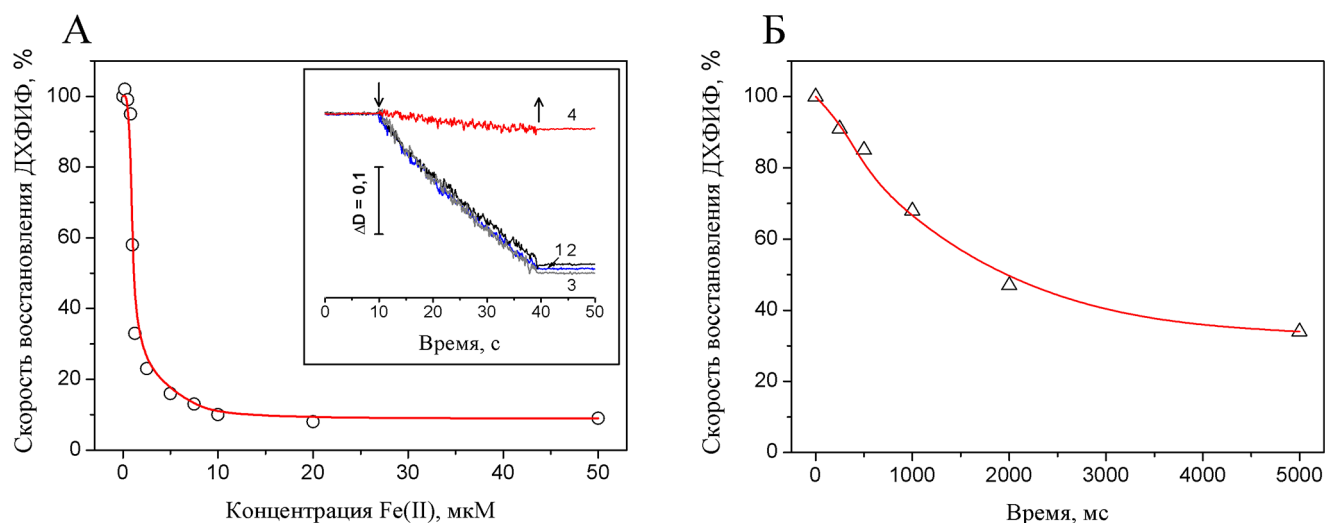


Рис. 1. Фотохимическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe(II) в препаратах ФС2(-Mn). **А.** Концентрационная зависимость блокирования высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe(II) в препаратах ФС2(-Mn) (фотоиндуцированное восстановление ДХФИФ в присутствии экзогенного донора электронов [Mn(II) + H₂O₂]) после 3-минутной инкубации при комнатном освещении и последующего центрифугирования. *Врезка:* Кинетические кривые восстановления ДХФИФ препаратами ФС2(-Mn): синяя кривая (1) — мембраны ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации в темноте и центрифугирования; черная кривая (2) — ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации с 10 мкМ Fe(II) в темноте и центрифугирования; серая кривая (3) — ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации с 3 мМ H₂O₂ в темноте и центрифугирования; красная кривая (4) — ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации с 10 мкМ Fe(II) на комнатном свете и центрифугирования. Концентрация ДХФИФ 40 мкМ, донорной системы — [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H₂O₂]. Концентрация хлорофилла 10 мкг · мл⁻¹. Приведены типичные кинетические кривые, полученные не менее, чем в трех повторностях. **Б.** Зависимость связывания Fe(II) (10 мкМ) с высокоаффинным участком ФС2(-Mn) от длительности вспышки насыщающего света. За 100% взята активность ФС2(-Mn) с донорной системой [Mn+H₂O₂] без предварительного освещения 140 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)⁻¹ · ч⁻¹.

в темноте (2) и на свету (4) (с последующим центрифугированием) при их освещении в присутствии донорной системы [Mn(II) + H₂O₂]. Рис. 1Б демонстрирует зависимость связывания 10 мкМ Fe(II) с высокоаффинным участком КВК от длительности вспышки насыщающего света. Очевидно, что условия световой инкубации препаратов ФС2(-Mn) с катионами Fe(II) сильно влияют на процесс блокирования ВАУ. Так, в режиме комнатного освещения при 3-минутной инкубации с 10 мкМ Fe(II) достигалось практически полное (~90%) блокирование ВАУ (рис. 1А), в то время как насыщающая вспышка длительностью 5 с при той же концентрации Fe(II) приводила лишь к ~70% его блокирования (рис. 1Б).

В последующих экспериментах мы изучили влияние H₂O₂ на возможность связывания катионов Fe(II) с ВАУ в темноте (рис. 2). С этой целью в препарат ФС2(-Mn) добавляли катионы Fe(II) в интервале концентраций 0–40 мкМ и инкубировали в темноте 0,5 мин. Оказалось, что темновая инкубация с Fe(II) не сопровождается блокированием ВАУ (см. рис. 1, кинетическая кривая 2 на врезке). Далее мы добавляли в образец H₂O₂ (3 мМ), после инкубации в течение 1 мин в темноте осаждали мембраны ФС2(-Mn) центрифугированием и суспендировали их в буфере А. Измерение электрон-транспортной активности (восстановление ДХФИФ) полученных препаратов при освещении в присутствии донорной пары Mn(II) + H₂O₂

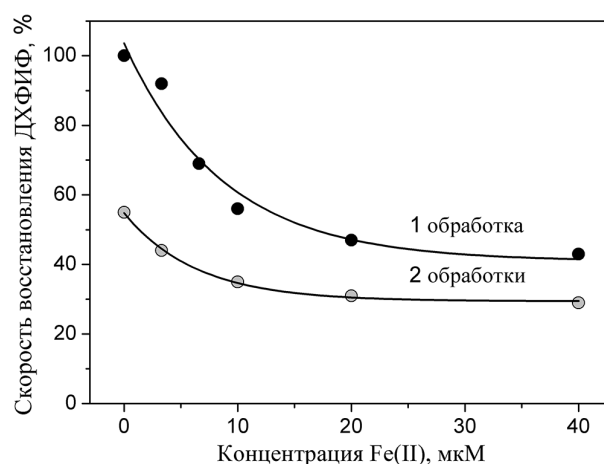


Рис. 2. Концентрационная зависимость блокирования высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe(II) в препаратах ФС2(-Mn) после их однократной и двукратной темновой обработки катионами Fe(II) с последующим добавлением H₂O₂. При однократной обработке препарат ФС2(-Mn) (50 мкг Хл · мл⁻¹) инкубировали в темноте с различной концентрацией катионов Fe(II) в течение 0,5 мин, после чего добавляли H₂O₂ (3 мМ) и через 1 мин инкубации в темноте центрифугировали. Осажденные мембраны суспендировали в буфере А (10 мкг Хл · мл⁻¹ в случае однократной обработки и 50 мкг Хл · мл⁻¹ в случае повторной). Скорость восстановления ДХФИФ (40 мкМ) измеряли в присутствии электрон-донорной системы [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H₂O₂] в условиях насыщающего света (●). Повторную обработку препаратов проводили через 1 мин идентичным первой способом (○). Данные являются средними арифметическими значений, полученных по крайней мере в 3 независимых экспериментах. Стандартная ошибка каждого находится в пределах ± 5%.

показало, что ВАУ после описанной обработки блокируется. Темновое блокирование четко выражено — остаточная активность около 50% при концентрации катионов Fe(II) 20 мкМ (рис. 2), но его интенсивность меньше, чем при фотохимическом блокировании — остаточная активность около 10% при концентрации катионов Fe(II) 8 мкМ (рис. 1). Полученный результат не может быть связан с темновой инкубацией с катионами Fe(II) (рис. 1, кинетическая кривая 2 на врезке). Блокирование не может быть связано и с влиянием H_2O_2 на ФС2(-Mn), о чем свидетельствуют данные, представленные на рис. 1 (кинетическая кривая 3 на врезке, эффект H_2O_2). Поскольку блокирование ВАУ осуществляется при связывании с ним окисленного катиона Fe(III) [3–4] мы предполагаем, что причиной ингибирования ВАУ в нашем темновом эксперименте является окисление катионов Fe(II) H_2O_2 (реакция Фентона) и последующего прочного связывания Fe(III) с ВАУ.

Кинетические исследования фотохимического блокирования показали, что этот эффект определяется связыванием не одного катиона Fe, а, по крайней мере, двух [4]. Учитывая тот факт, что препараты ФС2(-Mn) имеют только один участок

высокого сродства для связывания катиона Mn (и, соответственно, катиона Fe) [12], мы можем предположить следующий механизм фотохимического и химического блокирования, представленный, соответственно, на рис. 3А и 3Б. При фотохимическом блокировании первый катион Fe(II) связывается с низкой аффинностью с ВАУ, затем, после поглощения фотосистемой первого кванта света, окисляется радикалом тирозина $Y_Z^{\bullet}$, образующимся в результате разделения зарядов, а окисленный катион Fe(III) уже прочно связывается с ВАУ. В результате этого формируется новый участок связывания катиона Fe (как и в случае процесса фотоактивации — связывания катионов Mn при формировании кластера [2]). Связанный с ВАУ катион Fe(III) перемещается на новый участок, а к ВАУ подходит очередной катион Fe(II), взаимодействует с ним и окисляется тирозином после поглощения фотосистемой второго кванта света. В случае химического блокирования, механизм которого представлен на рис. 3Б, в темноте катион Fe(II) слабо связывается с ВАУ, а добавление к такому препарату H_2O_2 приводит к быстрому окислению его до трехвалентного состояния (реакция Фентона) и, соответственно, к прочному связыванию катиона Fe(III) с ВАУ.

А. Фотохимическое блокирование Б. Химическое блокирование

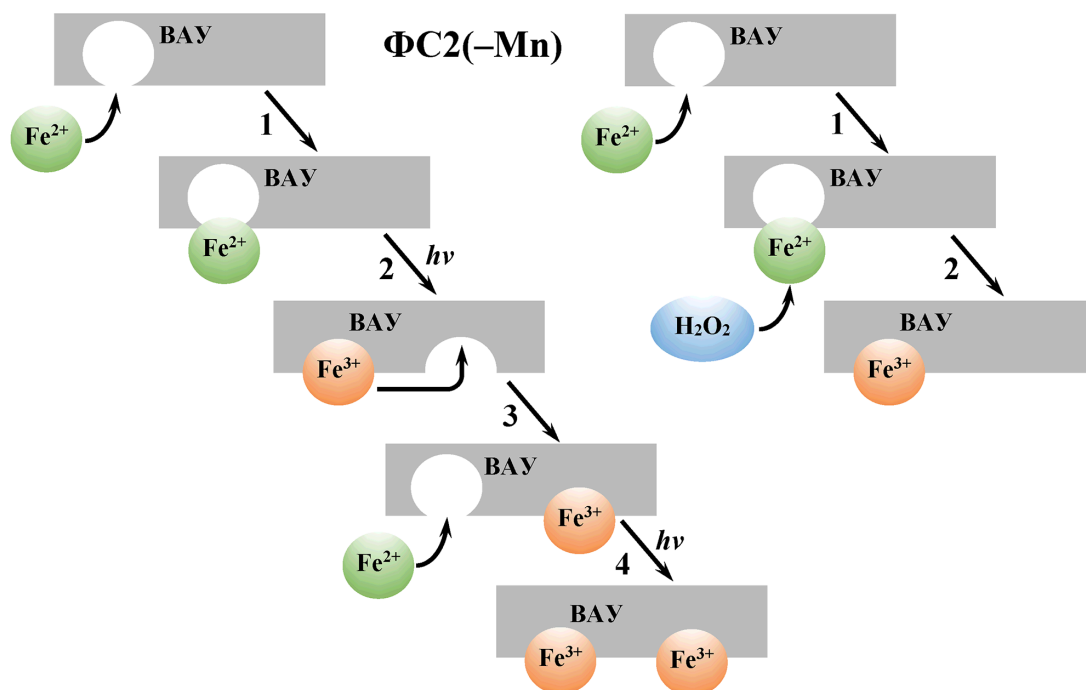


Рис. 3. Схема процессов фотохимического и химического блокирования высокоаффинного Мп-связывающего участка. **А.** Фотохимическое блокирование высокоаффинного Мп-связывающего участка катионами Fe. 1 — слабое связывание катиона Fe(II) с ВАУ; 2 — окисление Fe(II) тирозином $Y_Z^{\bullet}$ при поглощении ФС2 первого кванта света и появление нового участка связывания катиона Fe (возможно, участка связывания Мп3), инициированное прочным связыванием катиона Fe(III) с ВАУ; 3 — перемещение катиона Fe(III) с ВАУ на новый участок; 4 — окисление второго катиона Fe(II) при его взаимодействии с освободившимся ВАУ тирозином $Y_Z^{\bullet}$ при поглощении ФС2 второго кванта света. **Б.** Химическое блокирование высокоаффинного Мп-связывающего участка катионами Fe. 1 — слабое связывание катиона Fe(II) с ВАУ в темноте; 2 — окисление связанного с ВАУ катиона Fe(II) H_2O_2 и высокоаффинное связывание катиона Fe(III) с ВАУ, блокирующее электронный транспорт через этот участок.

Таблица

Химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка препаратов ФС2(-Mn) катионами Fe(II) в присутствии катионов Mn(II) или Ca(II)

Первичная обработка препаратов ФС2(-Mn)	Повторная обработка препаратов ФС2(-Mn)	Активность препаратов (скорость восстановления ДХФИФ)
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H ₂ O ₂	—	54,5%
+10 мкМ Fe(II) + 20 мкМ Mn(II)* → +3 мМ H ₂ O ₂	—	70%
+10 мкМ Fe(II) + 10 мМ Ca(II)* → +3 мМ H ₂ O ₂	—	82,5%
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H ₂ O ₂	+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H ₂ O ₂	36%
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H ₂ O ₂	+10 мкМ Fe(II) + 20 мкМ Mn(II)* → +3 мМ H ₂ O ₂	45,2%
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H ₂ O ₂	+10 мкМ Fe(II) + 10 мМ Ca(II)* → +3 мМ H ₂ O ₂	48,9%

Примечание: * — катионы Fe(II), Mn(II) или Ca(II) к препаратам ФС2(-Mn) добавляли одновременно и инкубировали смесь в течение 0,5 мин перед добавлением H₂O₂. 100% соответствует скорости восстановления ДХФИФ препаратами ФС2(-Mn) 140 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)⁻¹ · ч⁻¹. Перед измерением активности добавляли донорную систему [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H₂O₂]. Концентрации ДХФИФ и хлорофилла составляли 40 мкМ и 10 мкг · мл⁻¹ соответственно.

Подобный механизм может объяснить более низкую эффективность химического блокирования в случае окисления катиона Fe(II) H₂O₂. В случае фотохимического блокирования ингибирование ВАУ определяется окислением и связыванием двух катионов Fe [4], тогда как при химическом блокировании в темноте добавление H₂O₂ приводит к одномоментному окислению всех катионов Fe(II) — как ассоциированных с ВАУ, так и находящихся в суспензии — благодаря значительно превышению концентрации H₂O₂ (3 мМ) над концентрацией катионов Fe(II) (10–20 мкМ). Следовательно, при химическом блокировании может образоваться только один катион Fe(III), непосредственно связанный с ВАУ. С целью проверки этой гипотезы мы исследовали эффективность блокирования ВАУ после вторичной обработки препарата катионами Fe(II).

В проведенном эксперименте препарат ФС2(-Mn) проинкубировали в темноте с Fe(II) и затем с H₂O₂. Далее мембраны были отмыты от реактивов, и обработка была повторена. Результаты эксперимента показаны на рис. 2. Полученные данные свидетельствуют, что повторная обработка приводит к увеличению эффективности блокирования ВАУ, но степень блокирования так и не достигает величины, наблюдаемой при фотоокислении катионов Fe(II). Это может быть связано с неполной идентичностью этапов связывания катионов Fe(II) с ВАУ в случае фотохимического и химического блокирования, например, с большим различием во временном интервале между связыванием 1-го и 2-го катионов Fe.

Таким образом, прочное темновое связывание катиона Fe с ВАУ обеспечивается быстрым окислением Fe(II) сильным окислителем H₂O₂. В следующем эксперименте мы проверили воз-

можность инициирования связывания катиона Fe(II) другим окислителем — ДХФИФ (E_m лежит в диапазоне 130–217 мВ [13–14]). В этом случае блокирование тоже имеет место, но оно происходит менее эффективно, чем с H₂O₂. Остаточная активность после однократной 5-минутной инкубации составляла примерно 75%, а после повторной — примерно 50% (данные не приведены). Этот результат может быть обусловлен следующим. Взаимодействие катиона Fe(II) с H₂O₂ сопровождается не только окислением катиона, но и генерацией гидроксильного радикала. Можно предположить, что блокирование может определяться не прочным связыванием катиона Fe(III) с ВАУ, а ингибированием ВАУ гидроксильным радикалом. Однако такой механизм маловероятен. Во-первых, концентрация Fe(II) очень мала: 50%-ное блокирование при окислении катионов Fe(II) H₂O₂ наблюдается при их концентрации всего 5 мкМ (рис. 2). Во-вторых, ДХФИФ также инициирует блокирование, хотя в этом случае реакция окисления катионов Fe(II) протекает без образования этой активной формы кислорода.

В таблице приведены данные исследования влияния катионов нативного КВК на блокирование ВАУ катионами Fe(II), инициированное H₂O₂. Интересно отметить, что катионы Mn(II) в концентрации, вдвое превышающей концентрацию Fe(II) (20 мкМ и 10 мкМ соответственно), слабо ингибируют связывание катионов Fe с ВАУ, эффективность блокирования после однократной обработки снижается примерно на 15% (таблица). Это может быть связано с различным влиянием H₂O₂ на катионы Mn и Fe. H₂O₂ эффективно окисляет катионы Fe(II), тогда как по отношению к катионам Mn он является эффективным восстановителем [15–16]. Таким образом H₂O₂ препятствует

образованию катионов Mn(III) и тем самым подавляет конкуренцию катионов Mn с катионами Fe.

В отличие от катионов Mn(II) катионы Ca(II) более эффективно предотвращают блокирование ВАУ катионами Fe (остаточная активность после однократной обработки 83% при концентрации Ca(II) 10 мМ), хотя практически не связываются с ВАУ [17]. Но здесь следует отметить, что согласно данным рентгеноструктурного анализа [18] KBK имеет аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты D1-D170, связывающий между собой (мостик) катион Ca(II) и катион Mn⁴⁺, оккупирующий ВАУ. Поэтому довольно сильное влияние Ca(II) на связывание катиона Fe(II) с ВАУ может осуществляться через кальциевый участок.

Различия во влиянии катионов Mn(II) и Ca(II) на связывание катионов Fe с ВАУ при по-

вторной обработке препаратов ФС2(-Mn) практически исчезают. Эффективность блокирования после двукратной обработки катионами Fe(II) снижается примерно на 9% и 13% в случае добавления Mn(II) и Ca(II) соответственно (таблица). Возможно, перемещение связанного с ВАУ первого катиона Fe(III) на новый участок связывания приводит к конформационным изменениям и, как следствие, к нарушению взаимодействия между Ca-связывающим участком и ВАУ.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Järvi S., Suorsa M., Aro E.M. Photosystem II repair in plant chloroplasts — regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*. 2015;1847(9):900–909.
2. Oliver N., Avramov A.P., Nürnberg D.J., Dau H., Burnap R.L. From manganese oxidation to water oxidation: assembly and evolution of the water-splitting complex in photosystem II. *Photosynth. Res.* 2022;152(2):107–133.
3. Semin B.K., Ivanov I.I., Rubin A.B., Parak F. High-specific binding of Fe(II) at the Mn-binding site in Mn-depleted PSII membranes from spinach. *FEBS Lett.* 1995;375(3):223–226.
4. Semin B.K., Ghirardi M.L., Seibert M. Blocking of electron donation by Mn(II) to $Y_Z^{\bullet}$ following incubation of Mn-depleted photosystem II membranes with Fe(II) in the light. *Biochemistry*. 2002;41(18):5854–5864.
5. Semin B., Loktyushkin, A., Lovyagina E. Current analysis of cations substitution in the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biophys. Rev.* 2024;16(2):237–247.
6. Semin B.K., Seibert M. Substituting Fe for two of the four Mn ions in photosystem II — effects on water-oxidation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2016;48(3):227–240.
7. Semin B.K., Davletshina L.N., Seibert M., Rubin A.B. Creation of a 3Mn/1Fe cluster in the oxygen-evolving complex of photosystem II and investigation of its functional activity. *J. Photochem. Photobiol. B* 2018;178:192–200.
8. Widdel F., Schnell S., Heising S., Ehrenreich A., Assmus B., Schink B. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature*. 1993; 362(6423):834–836.
9. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II. *FEBS Lett.* 1983;153(1):231–234.
10. Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1989;975(3):384–394.
11. Armstrong J.M.D. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1964;86(1):194–197.
12. Ono T.A., Mino H. Unique binding site for Mn²⁺ ion responsible for reducing an oxidized Y_Z tyrosine in manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry* 1999;38(27):8778–8785.
13. Petrova A., Mamedov M., Ivanov B., Semenov A., Kozuleva M. Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes. *Photosynth. Res.* 2018;137(3):421–429.
14. Jahn B., Jonasson N.S., Hu H., Singer H., Pol A., Good N.M., Op den Camp H.J.M., Martinez-Gomez N.C., Daumann L.J. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020;25(2):199–212.
15. Inoué H., Akahori H., Noguchi M. Activation of electron donation from hydrogen peroxide by manganese in non-oxygen evolving photosystem II particles. *Plant Cell Physiol.* 1987;28(7):1339–1343.
16. Inoué H., Wada T. Requirement of manganese for electron donation of hydrogen peroxide in photosystem II reaction center complex. *Plant Cell Physiol.* 1987;28(5):767–773.
17. Semin B.K., Davletshina L.N., Goryachev S.N., Seibert M. Ca²⁺ effects on Fe(II) interactions with Mn-binding sites in Mn-depleted oxygen-evolving complexes of photosystem II and on Fe replacement of Mn in Mn-containing, Ca-depleted complexes. *Photosynth. Res.* 2021;147(2):229–237.
18. Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*. 2011;473(7345):55–60.

Поступила в редакцию 22.10.2024

После доработки 17.04.2025

Принята в печать 14.05.2025

RESEARCH ARTICLE

Dark chemical blocking of the high-affinity Mn-binding site of photosystem II by Fe(II) cations

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

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

**email: elena.lovyagina@gmail.com*

Binding of Fe(II) iron cation to high-affinity Mn-binding site (HAS) of photosystem II without oxygen-evolving complex (PSII(-Mn)) consists of several steps – a highly specific association of the Fe(II) cation with the HAS, oxidation of the bound cation with the tyrosine radical $Y_Z^{\bullet}$, generated as a result of light absorption by the primary donor P680 and charge separation in the reaction center, strong binding of the Fe(III) cation with HAS, which leads to HAS blocking (photochemical) with an iron cation. In the present work, we have shown that blocking HAS with an iron cation can be achieved not only by a photochemical process, but also by a chemical one: the Fe(II) cation weakly bound to HAS can be oxidized by hydrogen peroxide, which leads to the formation of Fe(III) and blocking of HAS by oxidized Fe cation as a result of strong binding. However, the effectiveness of chemical blocking is less than photochemical. This fact indicates that photochemical blocking is not a single quantum, but at least a two-quantum process. The data obtained indicate the two-quantum mechanism of a physiologically very important reaction – photoactivation (reconstruction of the manganese cluster in PSII(-Mn) particles during their incubation with Mn(II) cations).

Keywords: *photosystem II, photoactivation, oxygen-evolving complex, manganese-binding site, iron, hydrogen peroxide*

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторах

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

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

Васильев Никита Сергеевич – инженер кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: nik_vasil@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6877-2283>

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 579.222.3:574.23:574.24

Зависимость адаптации штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 к высокой солености среды от стадии роста и температуры**Л.Н. Ананьина^{1,*} , А.А. Горбунов² , Е.А. Шестакова¹** ¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов, Уральское отделение Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия, 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13;² Институт технической химии, Уральское отделение Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия, 614013, Россия, г. Пермь, ул. Академика Королева, д. 3

*e-mail: ludaananyina@mail.ru

При неблагоприятных условиях клетки бактерий синтезируют низкомолекулярные органические соединения, известные как совместимые вещества, которые даже в высоких концентрациях не оказывают негативного действия на метаболизм. В данной работе исследовали влияние температурного режима и фазы роста культуры на синтез этих соединений штаммом *Glutamicibacter* sp. SMB32, филогенетически родственным виду *Glutamicibacter halophytocola*, в условиях повышенной солености среды. В клетках на экспоненциальной фазе роста количество глутамата увеличивалось при повышении солености среды до 5% NaCl, но при 8% и 10% NaCl имело обратную зависимость от осмолярности среды культивирования. Содержание трегалозы в клетках штамма SMB32 возрастало с повышением солености среды до 5% NaCl, но в присутствии 8% и 10% NaCl ее количество значимо не изменялось. Положительная корреляция внутриклеточного количества с соленостью среды выявлена только для пролина. Между тем, в клетках, выросших до стационарной фазы роста в присутствии 5% и 10% NaCl, пролин не обнаружен. При этом в клетках возрастало содержание трегалозы. В настоящей работе впервые проведено исследование влияния комбинированного действия абиотических факторов на синтез вторичных метаболитов клетками бактерий рода *Glutamicibacter*. Показано, что одновременное действие высокого осмотического давления (5% NaCl) и повышенной температуры (32°C) приводит к аддитивному эффекту в отношении соединения, на синтез которого они влияли по отдельности. Так, в клетках штамма SMB32 отмечено многократное увеличение уровня синтеза трегалозы, задействованной в адаптации клеток как к повышенному осмотическому давлению среды, так и к воздействию высокой температуры. Комбинированное действие абиотических факторов не оказывало влияния на количество пролина в клетках. Полученные данные могут лечь в основу разработки методов управления метаболическим состоянием автохтонных бактерий рода *Glutamicibacter* путем внесения растворов совместимых веществ в соотношении, подобранном с учетом действующих абиотических факторов.

Ключевые слова: совместимые вещества, *Glutamicibacter*, температура, соленость, комбинированное действие абиотических факторов, адаптация

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-3

Введение

Бактерии рода *Glutamicibacter* широко распространены в природе [1–4]. Типовые штаммы валидных видов выделены как из природных биотопов [1, 5], так и из антропогенных экосистем [2, 6, 7]. Некоторые представители рода вступают в симбиотические отношения с эукариотами [3, 8]. Так, например, типовой штамм вида *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 был вы-

делен из корней растения, произрастающего на засоленной почве [3]. При этом штамм *G. halophytocola* KLBMP 5180 значительно способствовал росту растения-хозяина в условиях солевого стресса [9, 10]. Другие изоляты вида *G. halophytocola* известны своей способностью использовать в качестве источника углерода и энергии токсичные органические вещества [7]. Поэтому штаммы этого вида представляют интерес для

различных сфер деятельности человека — как для сельского хозяйства регионов, относящихся к зонам рискованного земледелия, так и для восстановления (очистки) загрязненных органическими соединениями экосистем.

Физико-химические характеристики мест обитания вида *G. halophytocola* весьма разнообразны: от засоленных и засушливых почв до шламохранилищ соледобывающего производства [3, 7, 11, 12]. Отметим, что представители этого вида наиболее солеустойчивы и растут в присутствии 13% NaCl [3, 5], в то время как штаммы большинства видов рода *Glutamicibacter* способны выдерживать только до 10% NaCl [1, 3, 5, 6, 8]. Филогенетически близкородственные виду *G. halophytocola* штаммы обнаружены в биотопах, расположенных в зонах восточно-азиатского муссонного [3, 11] и умеренно-континентального климатов [7, 12]. В этих климатических зонах в вегетационный период максимальное значение температуры атмосферного воздуха может превышать 30°C, при этом в дневные часы верхние слои почвы — типичного местообитания вида — нагреваются до более высоких температур. Температурный оптимум представителей рода *Glutamicibacter* находится около 28°C [1, 3, 5, 6, 8, 12]. Таким образом, можно резюмировать, что в естественной среде обитания клетки *G. halophytocola* сталкиваются с необходимостью адаптироваться одновременно к неблагоприятной температуре и колебаниям водного потенциала.

В условиях, отклоняющихся от оптимальных, в клетках бактерий происходят различные молекулярные и метаболические перестройки — в том числе индуцируется синтез низкомолекулярных органических соединений, которые, за исключением глутамата, являются вторичными метаболитами [13, 14]. Накапливаясь в высоких концентрациях в цитоплазме, эти соединения не нарушают физиологические процессы, поэтому получили название совместимых веществ. Совместимые вещества снижают активность воды, что может стать решающим фактором поддержания тургора клетки, стабилизации ферментов и других компонентов клетки [13]. Большая часть данных о механизмах адаптации бактерий получена с использованием популяций, находящихся либо в *лаг*-фазе, либо в фазе экспоненциального роста [15]. Однако засоление или засуха создают условия, при которых микробные популяции переходят в состояние, соответствующее стационарной фазе [15]. В настоящее время исследования совместимых соединений клетки в стационарной фазе роста на фоне действия неблагоприятного абиотического фактора немногочисленны. Известно, что при повышенной солености среды в стационарной фазе роста в клетках бактерий запускаются механизмы, приводящие к изменению состава совместимых веществ [16–19].

Хотя представители вида *G. halophytocola* занимают различные экологические ниши, сравнитель-

но мало известно о физиологических свойствах, которые позволяют этим бактериям выживать в экстремальных условиях окружающей среды. В настоящее время в литературе представлены данные о совместимых веществах, накапливаемых клетками представителей рода *Glutamicibacter* на примере штамма SMB32, филогенетически близкородственного виду *G. halophytocola*, на стадии замедления роста [12]. Для других представителей этого рода информация ограничена данными о наличии в геномах генетических детерминант, кодирующих ферменты синтеза таких совместимых соединений, как трегалоза, пролин и глутамат [11]. Целью настоящего исследования стало изучение совместимых соединений штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в условиях высокой солености среды в логарифмической и стационарной фазах роста, а также в условиях комбинированного действия повышенной солености среды и температуры.

Материалы и методы

В работе использовали мезофильный галотолерантный штамм *Glutamicibacter* sp. SMB32=BKM Ac-3019 [12]. Штамм идентифицирован на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК [20].

Подготовка биомассы для экстракции органических соединений. Бактериальную культуру выращивали в минеральной среде Раймонда [21], в которую для создания условий высокого осмотического давления добавляли NaCl до конечной концентрации 5%, 8% или 10%. Единственным источником углерода и энергии служила глюкоза в конечной концентрации 1 г/л. Инкубирование бактериальной культуры осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 (Элион, Россия) при 110 об./мин. Температура культивирования составляла 25°C или 32°C. Инокулятом (1% об./об.) служила культура, выращенная в присутствии 5% NaCl при 25°C. В зависимости от эксперимента штамм выращивали до логарифмической (ОП₅₄₀ 0,6–0,7) или стационарной фаз роста (ОП₅₄₀ 1,2). Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли на спектрофотометре BioSpec-mini UV/VIS (Shimadzu Corporation, Япония) при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

После завершения инкубирования клеточную суспензию объемом 100 мл делили на две равные части. Клетки осаждали на центрифуге 3К30 (Sigma, Германия) при 10000 g в течение 10 мин, температура соответствовала таковой в эксперименте. Клетки первой части сушили при 70°C до постоянного веса. Из клеток второй части проводили экстракцию органических соединений 80%-ным раствором этанола согласно опубликованной методике [22]. Высушенные экстракты хранили при 5°C до проведения анализа.

Спектроскопия протонного магнитного резонанса. Спектры записывали на приборе Bruker Avance Neo 400 (Bruker Corporation, США), оснащенный 5-мм широкополосным датчиком ВВО с Z-градиентом и системой термостатирования образца с точностью установки температуры 0,1°C, при 30°C. При записи спектров протонного магнитного резонанса (ЯМР ^1H) использовали 30-градусные импульсы, релаксационная задержка составляла 1 с, ширина окна была равна 5,9 кГц. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения Topspin, версия 4.0.8 (Bruker Corporation, США). Высушенный осадок этанольного экстракта растворяли в 0,5–1,0 мл тяжелой воды (ООО «Астрахим», Россия). Спектр предварительно записывали с 8 накоплениями, затем в пробу вносили 0,11–0,20 мг *трет*-бутилового спирта в качестве внутреннего стандарта и записывали спектр с 64 накоплениями, который использовали для количественных расчетов. Химические сдвиги (δ) указывали в миллионных долях (м.д.) и измеряли относительно сигнала метильных групп *трет*-бутилового спирта (1,24 м.д.). Водородный показатель растворов этанольных экстрактов снижали путем добавления серной кислоты с целью изменения химических сдвигов сигналов глутамата и пролина в область, свободную от сигналов других соединений. Однако подобный эффект не был достигнут для сигналов глутамина, поэтому определение внутриклеточного

количества этого соединения не проводили. Идентификацию сигналов в спектре и расчет количеств веществ в пробе проводили, как описано ранее Ананьиной с соавт. [12]. Далее осуществляли пересчет количеств веществ на мг сухого веса биомассы (мг СБ).

Статистическая обработка. Эксперименты выполнены в двух независимых повторах. При статистической обработке данных определяли среднее арифметическое, стандартное отклонение и достоверность различий средних значений по t-критерию Стьюдента согласно общепринятой методике [23].

Результаты и обсуждение

Совместимые вещества, накапливаемые клетками *Glutamicibacter* sp. SMB32 в логарифмической фазе роста при разной солености среды. Исследован пул совместимых веществ клеток штамма SMB32 в экспоненциальной фазе роста в присутствии в среде культивирования 5% и 10% NaCl. В клетках доминировали пролин, глутамат, глутамин и трегалоза (рис. 1А, В). Состав совместимых веществ исследованного штамма на экспоненциальной фазе роста соответствовал описанному ранее для его клеток на стадии замедления скорости роста [12]. Полученные результаты согласуются с данными о генах, кодирующих ферменты синтеза этих веществ, в геноме другого штамма вида *G. halophytocola* [11].

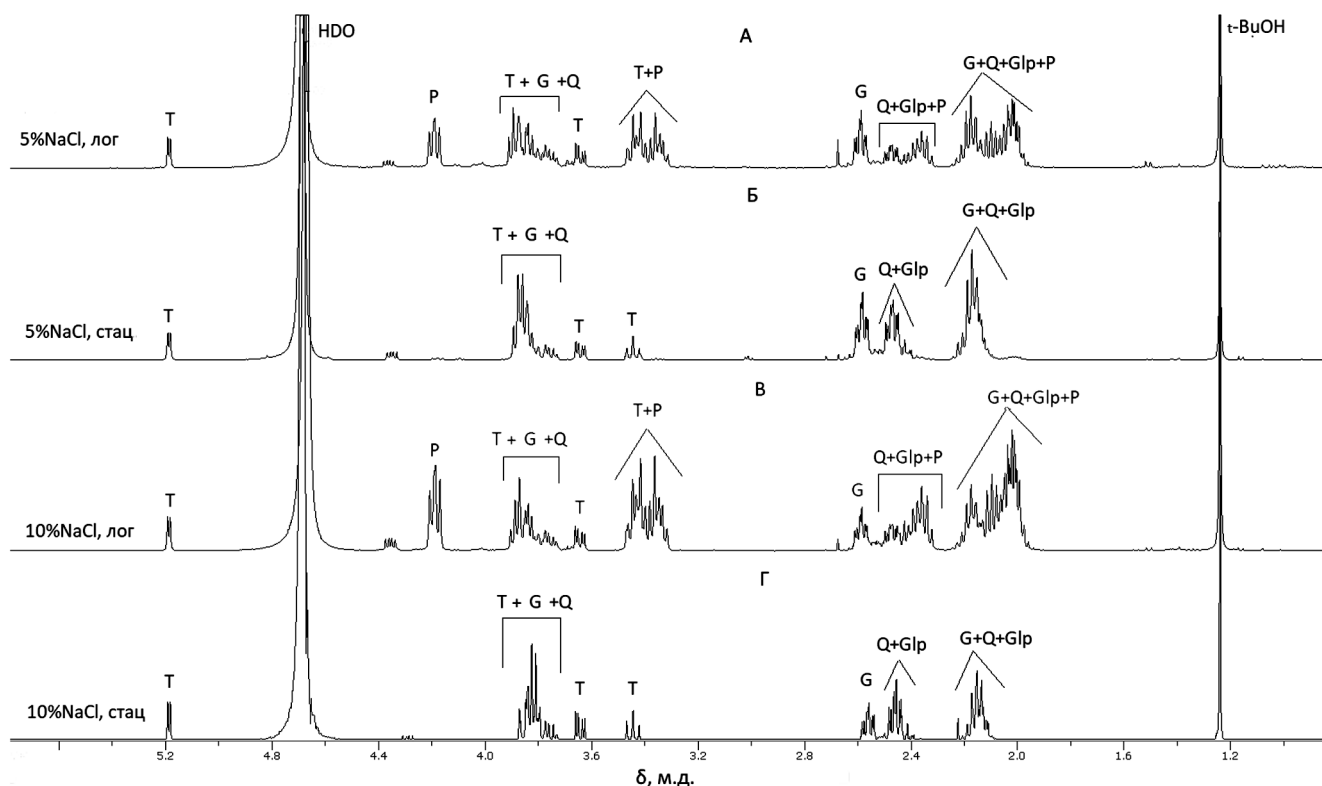


Рис. 1. Спектры ЯМР ^1H этанольных экстрактов из клеток *Glutamicibacter* sp. SMB32 в логарифмической и стационарной фазах роста. Условные обозначения: пролин (P), глутамат (G), трегалоза (T), глутамин (Q), оксопролин (Glp), молекуларная вода (H₂O), *трет*-бутиловый спирт (t-BuOH), 5%NaCl и 10%NaCl – концентрация NaCl в среде культивирования, лог – логарифмическая фаза роста, стац – стационарная фаза роста.

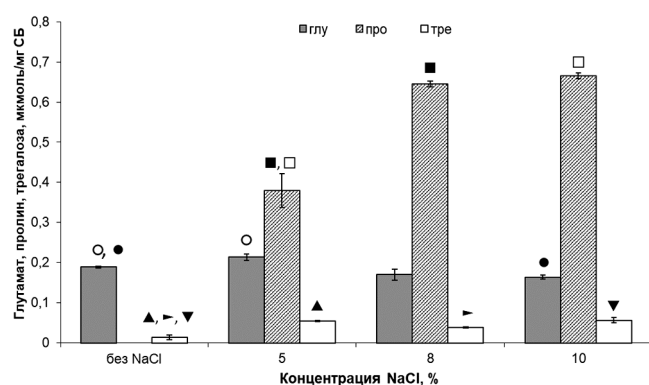


Рис. 2. Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 совместимых соединений при разной концентрации NaCl в среде культивирования. ▼, ►, ▲, □, ●, ■, ○ – различие между вариантами эксперимента значимо при $p < 0,05$.

Каждое из выявленных совместимых соединений показало определенные изменения в зависимости от солёности среды. Внутриклеточное количество глутамата увеличивалось в 1,13 раза при повышении солёности среды до 5% NaCl (рис. 2), но при 8 и 10% NaCl имело обратную зависимость от осмолярности среды культивирования, снижаясь в 1,15 раза при 10% NaCl. Пул трегалозы в клетках исследованного штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 возрастал в 4 раза с повышением солёности среды до 5% NaCl, но в присутствии 8% и 10% NaCl ее внутриклеточное количество значимо не изменялось (рис. 2). Положительная корреляция внутриклеточного количества с солёностью среды выявлена только для пролина (рис. 2). Его содержание в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 возрастало с солёностью среды до концентрации 8% NaCl (рис. 2). Последующее повышение концентрации NaCl в среде культивирования до 10% не приводило к увеличению содержания этой аминокислоты в клетках (рис. 2). В присутствии 8% и 10% NaCl пролин был преобладающей аминокислотой и превосходил в количестве глутамат и трегалозу (рис. 2). Полученные результаты демонстрируют ведущую роль пролина в адаптации штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 к высоким концентрациям соли (8% и 10% NaCl) в логарифмической фазе роста.

Накопление пролина в ответ на увеличение осмотического давления среды – довольно распространённое явление в мире прокариот и встречается у представителей разных филумов бактерий [19, 24, 25], в том числе актинобактерий [26, 27]. При этом в клетках бактерий, накапливающих пролин или другой азотсодержащий осмопротектор, например, эктоин, при солёности среды, стремящейся к верхнему пределу диапазона роста, отмечено снижение концентрации глутамата [19, 24, 25, 28]. Между тем, с увеличением степени галофилии прокариотного организма избыток глутамата возрастает [29]. Причиной этого может служить то, что на первом этапе осмоадап-

тации глутамат является противоионом для катионов калия или натрия, которые накапливаются в клетках бактерий при осмотическом стрессе [30]. Современные исследования показали, что только при низких концентрациях глутамата молекулы воды за его первой гидратной оболочкой подвергаются динамическому воздействию, а при концентрации глутамата, превышающей 0,3 М, гидратация, по-видимому, ограничивается водородными связями молекул воды с карбоксильными группами [31]. При умеренно высоких концентрациях (1,4 М) происходит сегрегация молекул воды и глутамата [32]. Вероятно, именно по причине особенностей взаимодействия глутамата с молекулами воды клетки бактерий синтезируют, например, пролин и трегалозу, в более концентрированных растворах которых эффект снижения гидратации выражен в меньшей степени [33, 34]. Однако бактерии, адаптирующиеся к повышению осмотического давления среды за счет увеличения внутриклеточного количества, дополнительно к глутамату одного вторичного метаболита – трегалозы – способны выдерживать NaCl в концентрации, как правило, до 5%, например, *Arthrobacter globiformis* [17, 18, 35, 36]. Пролин, в отличие от трегалозы, может кооперативно связывать ионы, что может снижать их отрицательное действие на ферменты клетки [34]. Это свойство делает пролин более предпочтительным осмолитом по сравнению с трегалозой при концентрациях NaCl выше 5%.

Совместимые вещества штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32, накапливаемые в стационарной стадии роста в условиях повышенной солёности среды. В стационарной фазе роста в присутствии 5% NaCl клетки исследованной бактерии не накапливали пролин (рис. 1Б). Эта особенность сохранялась при культивировании в присутствии 10% NaCl (рис. 1Г). В то же время в присутствии 5% NaCl количество трегалозы в клетках штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в стационарной фазе роста было выше в 1,3 раза, чем на стадии логарифмического роста (рис. 3).

Некоторые зубактерии, достигая стационарной фазы, в условиях повышенной солёности среды также накапливали в клетках сахара или их производные, при этом отмечен катаболизм осмопротекторных аминокислот [16–18]. На этой стадии роста возрастает экспрессия генов, кодирующих ферменты пути утилизации пролина [37] и синтеза трегалозы [38]. Известно, что в стационарной фазе роста происходит изменение морфологии клетки, уменьшение ее размера и объема за счет значительного снижения количества воды и неравномерного ее распределения [39]. Как полагают некоторые исследователи, трегалоза, во-первых, формирует стекловидное состояние цитозоля с низкой подвижностью молекул, которое приостанавливает любые внутриклеточные биохимические процессы, в том числе деградационные,

в ответ на потерю воды [40]. Отметим, что при сравнительном исследовании физико-химических свойств физиологического раствора с добавлением трегалозы или пролина процесс стеклования был отмечен только в растворах с трегалозой [41]. Во-вторых, трегалоза может образовывать водородные связи с биомолекулами по аналогии с водой, но не полностью замещает ее, что способствует сохранению функциональной конформации макромолекул при дефиците воды [33, 42, 43].

Внутриклеточные количества вторичных метаболитов при комбинированном действии абиотических факторов. Исследование комбинированного действия абиотических факторов на синтез пролина и трегалозы клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 проводили, культивируя штамм в присутствии 5% NaCl при температуре 32°C. Выбор этих условий был обусловлен тем, что при их действии по отдельности был выявлен тренд к снижению биомассы и скорости роста исследованной бактериальной культуры [12].

Одновременное действие повышенной солености среды и температуры не влияло на содержание пролина в клетках исследованного штамма. Так, при 25°C и 32°C в присутствии 5% NaCl в среде количество пролина в клетках в логарифмической фазе роста составляло $0,380 \pm 0,042$ и $0,375 \pm 0,049$ мкмоль/мг СБ соответственно (рис. 3). Однако содержание трегалозы было выше в клетках, выросших при 32°C, чем при 25°C, как в логарифмической, так и в стационарной фазах роста (рис. 3). Наибольшая разница, составляющая 3,4 раза, отмечена для стационарной фазы роста. В условиях повышенной осмолярности среды подобное влияние температуры на синтез трегалозы описано ранее на примере грамотрицательных бактерий [44–46]. Известно, что трегалоза стабилизирует белки в их нативном состоянии и уменьшает их денатурацию и агрегацию, вызванные нагреванием [40]. Кроме того, было показано, что накопление трегалозы при тепловом стрессе является более важным фактором, определяющим термотолерантность, чем индукция образования белков теплового шока [47].

Заключение

Местообитания штаммов вида *G. halophytocola* крайне разнообразны и отличаются физико-химическими свойствами. Между тем, их объединяет то, что они, как правило, характеризуются экстремальными условиями: повышенным содержанием солей или нехваткой воды, а также значением температуры, превышающим оптимальные. Выживание в подобных условиях возможно, если организм имеет механизмы адаптации, позволяющие сохранить клеточные структуры целыми. Важную роль в этом играют совместимые соединения. Для представителей рода *Glutamicibacter* они оставались малоизученными: имеющиеся данные ограничены сведе-

ниями о составе осмопротекторов на стадии замедления роста [12]. Настоящее исследование выявило зависимость состава совместимых соединений клетки в условиях повышенной солености среды от фазы роста штамма SMB32. Так, в осмоадаптации штамма на стадии активных биохимических процессов значимую роль играл пролин (рис. 2). В то же время, в стационарной фазе, которую рассматривают в качестве подготовки к покою, усиливался синтез трегалозы (рис. 3). В настоящей работе впервые проведено исследование влияния комбинированного действия абиотических факторов на синтез совместимых соединений, относящихся ко вторичным метаболитам клеток галотолерантных бактерий рода *Glutamicibacter*. Показано, что одновременное действие высокого осмотического давления и повышенной температуры приводит к аддитивному эффекту в отношении соединения, на синтез которого они влияли по отдельности. Так, в клетках штамма отмечено многократное увеличение уровня синтеза трегалозы (рис. 3), задействованной в адаптации клеток как к повышенному осмотическому давлению среды (рис. 2), так и к воздействию высокой температуры [12].

Полученные данные могут лечь в основу разработки методов управления метаболическим состоянием автохтонных бактерий рода *Glutamicibacter* путем внесения растворов совместимых веществ в соотношении, подобранном с учетом действующих абиотических факторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 24-26-20070. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

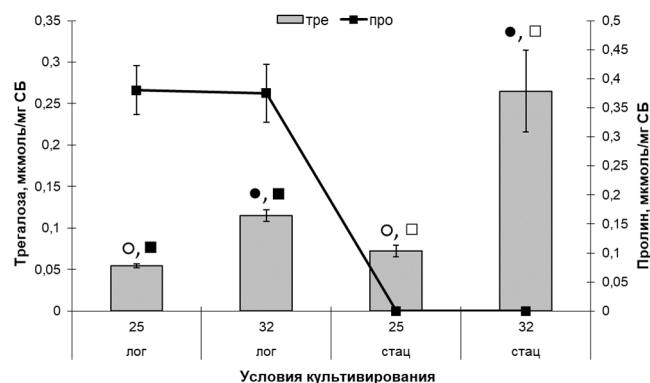


Рис. 3. Накопление клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 пролина и трегалозы в условиях повышенной солености среды в зависимости от температуры и фазы роста. Штамм выращивали в минеральной среде Раймонда, содержащей 5% NaCl. Условные обозначения: лог — логарифмическая фаза роста, стац — стационарная фаза роста, 25 и 32 — температура культивирования 25°C или 32°C соответственно, ■ — различие между вариантами эксперимента значимо при $p < 0,01$, ●, ○, □ — различие между вариантами эксперимента значимо при $p < 0,05$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. CHEN M., Xiao X., Wang P., Zeng X., Wang F. *Arthrobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment. *Arch. Microbiol.* 2005;183(4):301–305.
2. Irlinger F., Bimet F., Delettre J., Lefèvre M., Grimont P.A.D. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005;55(1):457–462.
3. Feng W.-W., Wang T.-T., Bai J.-L., Ding P., Xing K., Jiang J.-H., Peng X., Qin S. *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017;67(5):1120–1125.
4. Romaniuk K., Golec P., Dziewit L. Insight into the diversity and possible role of plasmids in the adaptation of psychrotolerant and metalotolerant *Arthrobacter* spp. to extreme Antarctic environments. *Front. Microbiol.* 2018;9:3144.
5. Das L., Deb S., Das S.K. *Glutamicibacter mishrai* sp. nov., isolated from the coral *Favia veroni* from Andaman Sea. *Arch. Microbiol.* 2020;202(4):733–745.
6. Roh S.W., Sung Y., Nam Y.-D., Chang H.-W., Kim K.-H., Yoon J.-H., Jeon C. O., Oh H.-M., Bae J.-W. *Arthrobacter soli* sp. nov., a novel bacterium isolated from wastewater reservoir sediment. *J. Microbiol.* 2008;46(1):40–44.
7. Ястребова О.В., Малышева А.А., Плотникова Е.Г. Галотолерантные бактерии рода *Glutamicibacter* – деструкторы терефталевой кислоты. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2022;58(5):476–483.
8. Wang H.-F., Li L., Zhang Y.-G., Hozzein W.N., Zhou X.-K., Liu W.-H., Duan Y.-Q., Li W.-J. *Arthrobacter endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of *Salsola affinis* C. A. Mey. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015;65(7):2154–2160.
9. Qin S., Feng W.-W., Zhang Y.-J., Wang T.-T., Xiong Y.-W., Xing K. Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growth-promoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018;84(19):e01533–18.
10. Xiong Y.-W., Gong Y., Li X.-W., Chen P., Ju X.-Y., Zhang C.-M., Yuan B., Lv Z.-P., Xing K., Qin S. Enhancement of growth and salt tolerance of tomato seedlings by a natural halotolerant actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 isolated from a coastal halophyte. *Plant Soil.* 2019;445:307–322.
11. Nishu S.D., Hyun H.R., Lee T.K. Complete genome sequence of drought tolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Glutamicibacter halophytocola* DR408. *Korean J. Microbiol.* 2019;55(3):300–302.
12. Ананьина Л.Н., Горбунов А.А., Шестакова Е.А., Пянкова А.А., Плотникова Е.Г. Совместимые вещества, накапливаемые клетками штамма *Glutamicibacter* sp. SMB32 в ответ на действие абиотических факторов окружающей среды. *Микробиология.* 2023;92(5):490–499.
13. Galinski E.A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia.* 1993;49(6):487–496.
14. Godard T., Zühlke D., Richter G., Wall M., Rohde M., Riedel K., Poblete-Castro I., Krull R., Biedendieck R. Metabolic rearrangements causing elevated proline and polyhydroxybutyrate accumulation during the osmotic adaptation response of *Bacillus megaterium*. *Front. Bioeng.* 2020;8:47.
15. Chodkowski J.L., Shade A. Exometabolite dynamics over stationary phase reveal strain-specific responses. *mSystems.* 2020;5(6):e00493–20.
16. Goude R., Renaud S., Bonnassie S., Bernard T., Blanco C. Glutamine, glutamate, and glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* Strain 3937. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70(11):6535–6541.
17. Roder A., Hoffmann E., Hagemann M., Berg G. Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005;243(1):219–226.
18. Essendoubi M., Brhada F., Eljamali J.E., Filali-Maltouf A., Bonnassie S., Georgeault S., Blanco C., Jebbar M. Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environ. Microbiol.* 2007;9(3):603–611.
19. Saum S.H., Müller V. Growth phase-dependent switch in osmolyte strategy in a moderate halophile: ectoine is a minor osmolyte but major stationary phase solute in *Halobacillus halophilus*. *Environ. Microbiol.* 2008;10(3):716–726.
20. Anan'ina L.N., Kosheleva I.A., Plotnikova E.G. Bacterial consortium as a model for studying the response of the microbial community of the Verkhnekamsk salt mining region to combined pollution. *Теоретическая и прикладная экология.* 2022;2:116–123.
21. Plotnikova E.G., Anan'ina L.N., Krausova V.I., Ariskina E.V., Prisyazhnaya N.V., Lebedev A.T., Demakov V.A., Evtushenko L.I. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium. *Microbiology.* 2011;80(5):703–712.
22. Bernard T., Jebbar M., Rassouli Y., Himdi-Kabbab S., Hamelin J., Blanco C. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* 1993;139(1):129–136.
23. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для университетов и педагогических институтов. М.: Высшая школа; 1973. 343 с.
24. Madkour M.A., Smith L.T., Smith G.M. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1990;56(9):2876–2881.
25. Brill J., Hoffmann T., Bleisteiner M., Bremer E. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *J. Bacteriol.* 2011;193(19):5335–5346.
26. Frings E., Kunte H., Galinski E.A. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiology Letters.* 1993;109(1):25–32.
27. Матвеева Н.И., Воронина Н.А., Борзенков И.А., Плакунов В.К., Беляев С.С. Состав и количественное содержание осмопротекторов в клетках нефтеокисляющих бактерий при разных условиях культивирования. *Микробиология.* 1997;66(1):32–37.
28. Anan'ina L.N., Gorbunov A.A., Pyankova A.A. Physiological response of the moderately halophilic psychrotolerant strain *Chromohalobacter* sp. N1 to salinity change and low temperature. *Can. J. Microbiol.* 2021;67(4):342–348.
29. Болтянская Ю.В., Деткова Е.Н., Шумский А.Н., Дулов Л.Е., Пушева М.А. Осмоадаптация у представителей галоалкалофильных бактерий из содовых озер. *Микробиология.* 2005;74(6):738–744.

30. Деткова Е.Н., Болтянская Ю.В. Связь между стратегией осмоадаптации, аминокислотным составом общего клеточного белка и свойствами некоторых ферментов галоалкалофильных бактерий. *Микробиология*. 2006;75(3):312–319.
31. Friesen S., Fedotova M.V., Kruchinin S.E., Buchner R. Hydration and dynamics of l-glutamate ion in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2021;23:1590–1600.
32. Daub C.D., Leung K., Luzar A. Structure of aqueous solutions of monosodium glutamate. *J. Phys. Chem.* 2009;113(21):7687–7700.
33. Pagnotta S.E., McLain S.E., Soper A.K., Bruni F., Ricci M.A. Water and trehalose: how much do they interact with each other. *J. Phys. Chem B*. 2010;114(14):4904–4908.
34. Dmitrieva O.A., Fedotova M.V., Buchner R. Evidence for cooperative Na⁺ and Cl[−] binding by strongly hydrated L-proline. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2017;19:20474–20483.
35. Zevenhuizen L.P. Levels of trehalose and glycogen in *Arthrobacter globiformis* under conditions of nutrient starvation and osmotic stress. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 1992;61(1):61–68.
36. Комарова Т.И., Коронелли Т.В., Тимохина Е.А. Роль низкомолекулярных азотистых соединений в осмоотолерантности бактерий родов *Rhodococcus* и *Arthrobacter*. *Микробиология*. 2002;71(2):166–170.
37. Köcher S., Tausendschön M., Thompson M., Saum S.H., Müller V. Proline metabolism in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus halophilus*: differential regulation of isogenes in proline utilization. *Environ. Microbiol. Rep.* 2011;3(4):443–448.
38. Hengge-Aronis R., Klein W., Lange R., Rimmele M., Boos W. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1991;173(24):7918–7924.
39. Jaishankar J., Srivastava P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Front. Microbiol.* 2017;8:2000.
40. Kumar N., Roy J.I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 2009;18(1):24–36.
41. Liu W., Huang Z., He X., Jiang P., Huo X., Lu Z., Liu B. Impacts of trehalose and l-proline on the thermodynamic nonequilibrium phase change and thermal properties of normal saline. *Cryobiology*. 2020;96:92–98.
42. Pereira C.S., Lins R.D., Chandrasekhar I., Freitas L.C.G., Hunenberger P.H. Interaction of the disaccharide trehalose with a phospholipid bilayer: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* 2004;86(4):2273–2285.
43. Ahlgren K., Olsson C., Ermilova I., Swenson J. New insights into the protein stabilizing effects of trehalose by comparing with sucrose. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2023;25(32):21215–21226.
44. Cánovas D., Fletcher S.A., Hayashi M., Csonka L.N. Role of trehalose in growth at high temperature of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 2001;183(11):3365–3371.
45. Reina-Bueno M., Argandoña M., Salvador M., Rodríguez-Moya J., Iglesias-Guerra F., Csonka L.N., Nieto J.J., Vargas C. Role of trehalose in salinity and temperature tolerance in the model halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *PLoS One*. 2012;7(3):e33587.
46. Reina-Bueno M., Argandoña M., Nieto J.J., Hidalgo-García A., Iglesias-Guerra F., Delgado M.J., Vargas C. Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiol.* 2012;12:207.
47. Kandrór O., DeLeon A., Goldberg A.L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(15):9727–9732.

Поступила в редакцию 27.09.2024

После доработки 21.04.2025

Принята в печать 19.05.2025

RESEARCH ARTICLE

Dependence of the adaptation of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32 to high salinity environment depending on growth stage and temperature

L.N. Anan'ina^{1,*} , A.A. Gorbunov² , E.A. Shestakova¹ 

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Filial of the Perm Federal Research Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 13, Golev St., Perm, 614081, Russia;

² Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Filial of the Perm Federal Research Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 3, Akadimika Koroleva str., Perm, 614013, Russia

*e-mail: ludaananyina@mail.ru

The pool of compatible solutes of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32, phylogenetically closely related to the species *Glutamicibacter halophytocola*, was studied under high salinity conditions depending on the growth phase and temperature. In cells at the exponential growth phase, the intracellular amount of glutamate increased with an increase in the salinity of the medium to 5% NaCl, but at 8 and 10% NaCl it had an inverse relationship with the osmolality of the cultivation medium. The pool of trehalose in the cells of the strain SMB32 increased with an increase in the salinity of the medium to 5% NaCl, but in the presence of 8 and 10% NaCl its intracellular amount did not change significantly. A positive correlation between the intracellular amount and the salinity of the medium in *Glutamicibacter* sp. SMB32 cells was found only for proline. In the

cells grown to the stationary growth phase in a medium containing 5 and 10% NaCl, proline was not detected. At the same time, the content of trehalose in the cells increased. In this work, the effect of the combined action of abiotic factors on the synthesis of secondary metabolites by cells of bacteria of the genus *Glutamicibacter* was studied for the first time. It was shown that the simultaneous action of high osmotic pressure (5% NaCl) and elevated temperature (32°C) leads to an additive effect with respect to the compound, the synthesis of which they affect separately. Thus, in the cells of the SMB32 strain, a multiple increase in the synthesis of trehalose was noted, which is involved in the adaptation of cells both to the increased osmotic pressure of the medium and to the effect of high temperature. While the simultaneous action of abiotic factors did not affect the amount of proline in the cells. Our observations revealed that trehalose is critical for growth at high temperatures, and in the adaptation of the strain *Glutamicibacter* sp. SMB32 to high salt concentrations the leading role belongs to proline. The data obtained can be used for the development of methods for controlling the metabolic state of autochthonous bacteria of the genus *Glutamicibacter* by introducing solutions of compatible solutes with their ratio, selected taking into account the current abiotic factors.

Keywords: *compatible solutes, Glutamicibacter, temperature, salinity, combined effect of abiotic factors, adaptation*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation and the Ministry of Education and Science of the Perm Krai №24-26-20070.

Сведения об авторах

Ананьина Людмила Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории микробиологии техногенных экосистем, филиал ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН». Тел.: 8-342-280-84-31; e-mail: ludaananyina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4721-2863>

Горбунов Алексей Аркадьевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории синтеза активных реагентов, филиал ПФИЦ УрО РАН «Институт технической химии». Тел.: 8-342-237-82-87; e-mail: agorbunof@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8267-4361>

Шестакова Елена Анатольевна — инженер лаборатории микробиологии техногенных экосистем, филиал ПФИЦ УрО РАН «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук». Тел.: 8-342-280-84-31; e-mail: shestakova.e@iegm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3494-2886>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.044+57.084.2

Гиперспектральный мониторинг влияния средств защиты растений на состояние семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) при моделировании их ирригации карьерными сточными водами

А.Е. Соловченко^{1,*} , Б.М. Шурыгин¹ , И.О. Селях¹ , Л.Р. Семенова¹ ,
П.Н. Щербаков¹ , О.Б. Чивкунова¹ , А.А. Лукьянов¹ ,
Е.С. Михайлова², В.А. Крюк² , Е.С. Лобакова¹

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

² Кемеровский государственный университет, Институт нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных технологий, Россия, 625000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

*e-mail: solovchenkoae@my.msu.ru

Очистка карьерных сточных вод, как и рекультивация выработанных угольных разрезов, — серьезные экологические проблемы. Один из способов их решения — фиторемедиация с использованием стрессоустойчивых растений, таких как сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Для снижения риска эпифитотий при массовом выращивании необходимы обработки химическими средствами защиты растений (СЗР). Важно убедиться, что СЗР не наносят вреда растениям при использовании для полива растений карьерных сточных вод, содержащих тяжелые металлы. В этой связи весьма актуальна задача массового мониторинга растений неинвазивными методами. В работе использованы методы прямых измерений и неинвазивный подход, основанный на съемке и анализе гиперспектральных изображений, для комплексного мониторинга состояния семян сосны, обработанных СЗР «Актара» и «Превикур Энерджи» в разных концентрациях (однократной, двукратной и четырехкратной по сравнению с концентрацией, рекомендованной производителем) на фоне полива растворами минеральных солей, имитирующих карьерные сточные воды угольных разрезов по составу основных компонентов. Показано, что, несмотря на некоторые методические сложности съемки и количественной интерпретации гиперспектральных изображений, возможно их использование для неинвазивного дистанционного мониторинга состояния семян хвойных растений в вегетационных экспериментах, в том числе — в полевых условиях. СЗР, применяемые в исследованных дозах, не обладали острой токсичностью и не оказывали выраженного негативного влияния на темпы роста и состояние пигментного аппарата семян сосны обыкновенной в двухмесячный период наблюдений. При этом полив этих растений модельными карьерными сточными водами также не сопровождался синергическими токсическими эффектами. Таким образом, не выявлено очевидных препятствий к применению вышеупомянутых СЗР для профилактики и стоп-обработок семян сосны обыкновенной, выращиваемых с поливом карьерными сточными водами, содержащими Fe, Zn и Mn. Полученные результаты также свидетельствуют о перспективности использования карьерных сточных вод, богатых элементами минерального питания, но не содержащих высокотоксичных тяжелых металлов (таких, как Pb и Cd), при выращивании растений для фиторемедиации почв выработанных угольных разрезов. Однако для оценки отдаленных во времени эффектов необходимы длительные, желательно многолетние, исследования.

Ключевые слова: неинвазивный мониторинг, фиторемедиация, вегетационные индексы, пестициды, тяжелые металлы, микроводоросли

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-4

Введение

Рост численности населения Земли сопровождается увеличением добычи и потребления ресурсов, в том числе ископаемых энергоносителей, что приводит к росту антропогенной нагрузки на окружающую среду. Любая форма добычи полезных ископаемых, включая добычу угля открытым способом, представляет опасность для окружающей среды, загрязняя поверхностные и грунтовые воды, почву, пахотные земли и воздух [1]. Карьерные сточные воды — один из наиболее объемных отходов угледобычи открытым способом: миллионы литров недостаточно очищенных шахтных стоков сбрасываются в водоемы [2]. По общему признанию, очистка карьерных сточных вод, как и рекультивация выработанных угольных разрезов, является серьезной экологической проблемой во всем мире.

Карьерные сточные воды образуются при проникновении в карьеры грунтовых вод и (или) дождевой воды [1]. Этот вид сточных вод может быть загрязнен нефтью, остатками взрывчатых веществ и ионами тяжелых металлов, таких как Pb, Co, Cd, Cu, Fe, Mn и Zn [1]. Токсичность тяжелых металлов для биоты водных и наземных экосистем, а также для человека хорошо известна [3].

К сожалению, эффективных способов полезной утилизации карьерных сточных вод пока не найдено, а существующие физико-химические методы их очистки малоэффективны и дороги [4–6]. В то же время, растет внимание к биологическим методам очистки и рекультивации биотопов, нарушенных при открытой разработке полезных ископаемых, в особенности — к фиторемедиации [7, 8]. В частности, привлекательна идея использования карьерных сточных вод как источника микро- и макроэлементов минерального питания при выращивании плантационных быстрорастущих растений для целей фиторемедиации [5, 9].

Для фиторемедиации угольных разрезов необходимо массовое выращивание растений, таких как сосна обыкновенная и другие быстрорастущие стрессоустойчивые виды. Решение этой задачи предполагает высокую плотность насаждений, особенно на начальных этапах получения посадочного материала в парниках и открытом грунте. Как следствие, возрастает риск эпифитотий, вызванных атаками насекомых-вредителей и/или фитопатогенных грибов. В этой связи проводят профилактические обработки химическими средствами защиты растений (СЗР) в рекомендованных концентрациях, но если эпифитотии все же развиваются, приходится прибегать к так называемым стоп-обработкам, увеличивая их концентрацию. В подобных ситуациях важно убедиться в том, что относительно высокие концентрации СЗР не нанесут вреда самим растениям, особенно при использовании для полива растений карьерных сточных вод, содержащих тяжелые металлы, потенциально

способные потенцировать токсические эффекты СЗР [10, 11]. Прямые измерения морфологических, биохимических и иных параметров являются классическими методами оценки физиологического состояния растений. Эти методы отличаются высокой точностью, но при этом требуют высоких затрат труда и потому их пропускная способность невелика: ее достаточно для лабораторных или полевых экспериментов на ограниченной выборке индивидуальных растений. Однако мониторинг больших популяций в масштабных экспериментах — например, при высокопроизводительном фенотипировании растений — невозможен с применением вышеупомянутых традиционных методов.

В этой связи весьма актуальна задача массового мониторинга растений не только в лабораторном масштабе, но и в масштабе насаждений, когда оперативно отследить состояние всех растений традиционными методами, основанными на ручных измерениях и лабораторном биохимическом анализе, невозможно. Решение этой задачи важно для оперативной оценки состояния больших популяций растений, поиска симптомов атак фитопатогенов, а также для оценки толерантности к действию неблагоприятных факторов [12], в том числе антропогенных. В этой связи все чаще для автоматизированного массового мониторинга растительных объектов применяют неинвазивные методы, основанные на пространственно-разрешенном спектральном анализе отраженного растениями света, для чего используют изображающие гиперспектрометры [13]. Наряду с экомониторингом, эта методология получила наибольшее развитие в сезонном сельскохозяйственном мониторинге [14]. Несмотря на значительный прогресс в области дистанционного неинвазивного фенотипирования растений [15, 16], по-прежнему возникают сложности с извлечением смысловой информации из спектральных изображений растительных объектов, но в последнее время их преодолевают с помощью современных методов на основе машинного обучения [17]. Актуальными остаются и традиционные методы анализа спектральных данных, основанные на вегетационных индексах [18].

Целью настоящей работы был комплексный мониторинг состояния сеянцев сосны, обработанных СЗР в различных концентрациях на фоне полива карьерными сточными водами. Также оценивали возможности использования неинвазивных гиперспектральных методов для фенотипирования экспериментальных растений.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами исследования служили однолетние сеянцы сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), выращенные из семян, собранных в ненарушенных местообитаниях, на коммерчески доступном торфяном субстрате в агрокассетах. Перед началом вегетационного экспе-

римента растения пересаживали в стандартные горшки «Р9» на субстрат из смеси просеянного речного песка и перлита (1:2, по объему), увлажняли водопроводной водой (250 мл/растение) и размещали в условиях открытого грунта в стандартных поддонах (по 20 растений в поддоне). После 7 сут акклимации отбраковывали растения с визуально заметными повреждениями, растения с длиной центрального побега менее 4 см и разветвленные растения (более двух побегов).

Экспериментальные воздействия. В экспериментах по оценке острой токсичности СЗР использовали распространенные коммерчески доступные препараты «Актара» (неоникотиноидный инсектицид производства компании Syngenta, действующее вещество – тиаметоксам [19]) и «Превикур Энерджи» (системный фунгицид производства компании Bayer, действующие вещества – пропамокарб и фосэтил) [20] в концентрации, рекомендованной производителем, а также в двух- и четырехкратно увеличенных концентрациях по отдельности и в сочетании друг с другом (табл. 1).

Рабочие растворы СЗР вносили под корень в объеме 10 мл/растение однократно, в начале эксперимента; под контрольные растения вносили 10 мл водопроводной воды. В каждом экспериментальном варианте было 10 растений, рандомизированно размещенных на открытой экспериментальной площадке в кампусе МГУ.

Для полива экспериментальных растений (по 0,15 л/растение, шестикратно с равными временными интервалами) использовали модельные сточные среды, состав которых воспроизводит состав карьерных сточных вод угольного разреза «Моховский» (Кемеровская область, Россия; 54.5984N, 86.3437E) в отношении максимальных зарегистрированных концентраций ключевых загрязнителей, в частности, тяжелых металлов – Fe, Zn и Mn (табл. 2; см. также ранее опубликованные данные [9]); контрольные растения поливали водопроводной водой. По мере подсыхания субстрата растения дополнительно увлажняли водопроводной водой. Мониторинг состояния растений вели с мая по июль включительно.

Таблица 1

Схема постановки эксперимента

Экспериментальные варианты	Концентрация СЗР (г/л)		Обозначения
	«Актара»	«Превикур Энерджи»	
Контроль	0	0	К
Обработка препаратом «Актара»	0,4*	0	А1
	0,8	0	А2
	1,6	0	А4
	0	1,5*	П1
Обработка препаратом «Превикур Энерджи»	0	3	П2
	0	6	П4
	0,4*	1,5*	АП1
Комбинированная обработка	0,8	3	АП2
	1,6	6	АП4

*Концентрации, рекомендованные производителем.

Таблица 2

Состав модельных сточных вод

Компонент сточных вод	Использованный реагент	В модельных сточных водах (мг/л)	В реальных сточных водах** (мг/л)
Аммоний-ионы	NH ₄ NO ₃	3,4	1,19 (3,25–0,10)
Нитрат-ионы	KNO ₃	94,7	45,0 (92,0–0,38)
Нитрит-ионы	KNO ₂	0,667	0,36 (0,67–0,003)
Сульфат-ионы	MgSO ₄	368	295 (367–22,0)
Фосфат-ионы	K ₂ HPO ₄	0,95	0,52 (0,95–0,1)
<u>Железо*</u>	FeCl ₃ · 6H ₂ O	42,42	8,80 (43,5–0,08)
<u>Марганец</u>	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,35	0,14 (0,30–0,05)
<u>Цинк</u>	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,8	0,035 (2,90–0,02)
pH	—	pH 8,5	pH 8,4 (8,7–7,3)
Водопроводная вода	—	До 1 л	—

* Подчеркнуты ключевые загрязнители – тяжелые металлы.

** Приводятся средние значения, в скобках указан размах колебаний в течение сезона (апрель–октябрь 2023 г.).

Измерение прироста побегов. Физиологическое состояние растений оценивали по темпам прироста главного побега и суммарному содержанию основных пигментов (хлорофиллов и каротиноидов; см. ниже) в надземной части сеянцев.

Рост растений регистрировали прямым измерением длины побега. В связи со значительной гетерогенностью экспериментальных растений по длине главного побега (рис. 1А) для сравнения их темпов роста использовали относительную величину прироста, которую вычисляли как:

$$D = (L_t / L_0 - 1) \cdot 100\%, \quad (1)$$

где D — относительная величина прироста (%), L_0 — длина побега в момент начала наблюдений (см), L_t — длина побега в момент времени t (см).

Неинвазивный мониторинг состояния растений. Суммарное содержание пигментов в надземной части растений оценивали неинвазивно по их гиперспектральным изображениям (размер кадра — 512×512 пикселей, спектральное разрешение — 3 нм), полученным с применением гиперспектрометра IQ (SPECIM, Финляндия). Радиометрическая калибровка снимков проводилась с синхронной съемкой отражательного стандарта — панели из спектралона. Съемки проводили при естественном освещении в период с 10 до 15 ч местного солнечного времени. Для оценки содержания пигментов использовали вегетационные индексы, рассчитанные на основании коэффициентов отражения растений в видимой и ближней ИК-областях спектра [21]. Для оценки содержания хлорофиллов (Хл) использовали разработанный ранее индекс CI_{678} (Chlorophyll Index), чувствительный к содержанию Хл в растительных тканях [22, 23], вычисляемый по формуле:

$$CI_{648} = \frac{R_{800}}{R_{700}}, \quad (2)$$

в которой R_{800} — «опорный» коэффициент отражения на длине волны 800 нм, где отсутствует поглощение света пигментами, а величина отражения определяется морфологическими и анатомическими особенностями растительных тканей; R_{700} — коэффициент отражения на длине волны 700 нм, в области «красного склона» (Red Edge) спектра отражения, соответствующего резкому росту альбедо в инфракрасной области, вызванному рассеянием света в структурах листа [24].

Суммарное содержание каротиноидов оценивали по значениям индекса CRI_{550} (Carotenoid Reflectance Index, [23]):

$$CRI = \left(\frac{1}{R_{550}} - \frac{1}{R_{700}} \right) \cdot R_{800}, \quad (3)$$

где R_{550} — коэффициент отражения на длине волны 550 нм, зависящий от совместного поглощения света каротиноидами и хлорофиллами, спектры

поглощения которых перекрываются в этой области спектра.

Для выделения растений на гиперспектральных снимках строили ограничивающие прямоугольники по локальным минимумам проекции плотности пикселей с $CI > 2,8$ на горизонтальные и вертикальные оси изображения, при необходимости ограничивающие прямоугольники уточняли вручную. Для фильтрации фона внутри ограничивающих прямоугольников использовали спектрально-угловую классификацию (Spectral Angle Mapping, SAM) [25, 26], эталонные спектры для SAM выбирали вручную.

Статистическая обработка результатов. Нормальность распределения экспериментальных данных проверяли с применением критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различий средних значений определяли в ходе двухфакторного дисперсионного анализа средствами программного обеспечения Origin 19 (OriginLabs, США) при уровне значимости $p < 0,05$.

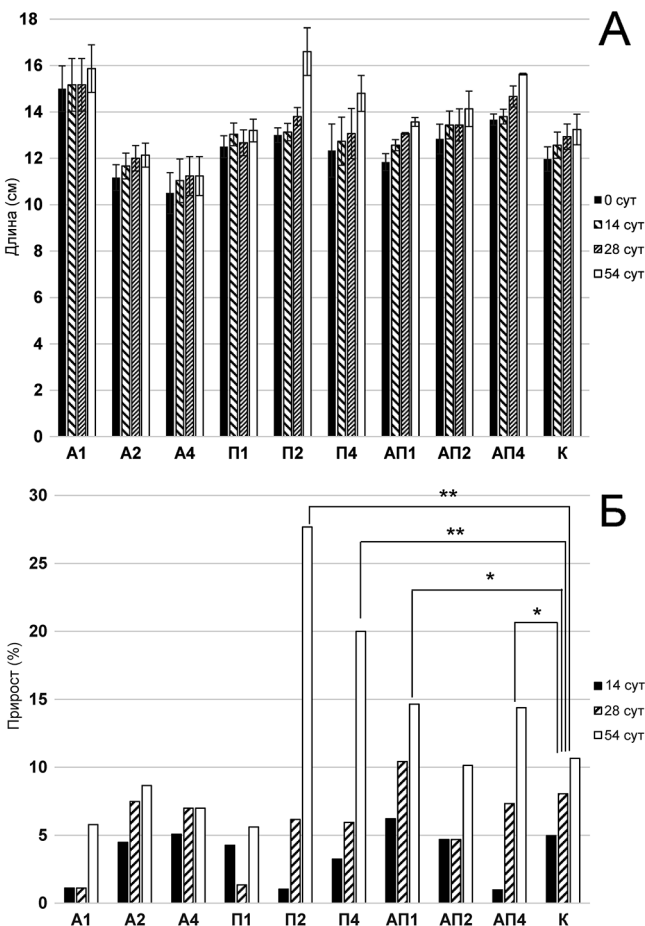


Рис. 1. Динамика длины главного побега сеянцев сосны обыкновенной при выращивании в присутствии СЗР в различных концентрациях. (А) Абсолютные значения длины побегов, (Б) относительные значения прироста. Сроки выращивания указаны на диаграммах. Обозначения: К — контроль без обработки, А — «Актара», П — «Превикур Энерджи», АП — «Актара» + «Превикур Энерджи» (см. табл. 1). На диаграмме показаны средние значения $\pm$ стандартная ошибка ($n = 10$) и уровень значимости различий между ними (* — $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Мониторинг влияния карьерных сточных вод на состояние сеянцев сосны является важной задачей, поскольку сточные воды могут быть источником как необходимых для растений микро- и макроэлементов минерального питания, так и потенциально токсичных тяжелых металлов. Таким образом, важно было оценить возможность использования различных методов для мониторинга насаждений в теплицах и питомниках. В настоящей работе для этого использовали как простые непосредственные измерения (прямое измерение роста побегов), так и автоматизированные неинвазивные методы в приложении к анализу гиперспектральных изображений.

Влияние СЗР на темпы роста сеянцев сосны обыкновенной. Мониторинг динамики роста сеянцев сосны в присутствии исследованных СЗР в различных концентрациях (рис. 1) не выявил значимого снижения величины прироста главного побега по сравнению с контролем. При этом у растений, обработанных СЗР «Актара» в четырехкратной концентрации, рост замедлялся к концу периода наблюдений. Напротив, рост растений, обработанных СЗР «Превикур Энерджи», в т. ч. в комбинации с СЗР «Актара», был в этот период более интенсивным по сравнению с необработанным контролем (рис. 1Б). Максимальная величина прироста (в 2,5 раза больше, чем в контроле) была зарегистрирована в конце периода наблюдений у растений, обработанных СЗР «Превикур Энерджи» в двукратной концентрации. При обработке тем же СЗР в четырехкратной концентрации величина приростов в 1,5 раза превосходила таковую в необработанном контроле (рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии выраженного токсического действия обоих исследованных СЗР в концентрации до четырехкратной по отношению к рекомендованной производителем на сеянцы сосны обыкновенной, выращиваемые с использованием карьерных сточных вод. В случае СЗР «Актара» возможно двукратное повышение концентрации препарата без значительного негативного влияния на рост растений. Существенно также, что комбинированная обработка двумя СЗР (варианты АП1–АП4, рис. 1) не влияла на величину приростов либо обладала слабым стимулирующим влиянием.

Особый интерес представляет стимулирующее влияние СЗР «Превикур Энерджи» на рост побегов сосны в наших экспериментальных условиях. Наблюдаемый эффект может быть связан как с подавлением роста фитопатогенных грибов при выращивании в открытом грунте, так и с непосредственным стимулированием роста растений данным препаратом. Так, пропамокарб ингибирует рост мицелия и образование зооспорангиев, а фозетил подавляет образование спор, предотвращает

проникновение в растение, а также стимулирует системную устойчивость к болезням и ускоряет рост растений [27]. С другой стороны, наблюдаемый эффект напоминает гистерезис, характерный для действия многих препаратов (таких как гербицид 2,4Д), которые в низких концентрациях могут стимулировать рост растений, а в более высоких — ингибировать его. Косвенным подтверждением ростостимулирующего действия СЗР в наших экспериментальных условиях может служить возобновление роста главного побега (завершившегося после формирования сезонного прироста), на 40–45-е сут эксперимента. Данное явление наблюдали во всех вариантах обработки, при этом в необработанном контроле возобновление роста наблюдали лишь у одного из 10 растений.

Гиперспектральный неинвазивный мониторинг состояния растений. Используемые в настоящей работе подходы к интерпретации данных о спектральном составе отраженного растениями света основаны на использовании вегетационных индексов, чувствительных к содержанию основных групп пигментов растений — хлорофиллов и каротиноидов [22, 23]. Мониторинг изменений содержания и соотношения этих пигментов дает ценную информацию о физиологическом состоянии растительных объектов, их развитии, а также о повреждениях, вызванных абиотическими и биотическими стрессорами [23, 28]. Подчеркнем также, что традиционные биохимические методы анализа дают информацию лишь о весьма небольшой части растения (например, о содержании пигментов в части листа или побега). Напротив, неинвазивные методы, основанные на анализе гиперспектральных изображений, позволяют описать динамику исследуемого параметра (например, пигментного состава) для целого растения с учетом его гетерогенности, которая может быть существенной [21].

Известно, что растения, обладающие более высокой толерантностью к различным стрессорам, обладают и более высоким общим содержанием хлорофиллов, а стрессовые ответы часто включают редукцию фотосинтетического аппарата, снижение содержания хлорофиллов и рост содержания каротиноидов [28]. В настоящей работе гиперспектральные изображения использовали для оценки удельного содержания этих пигментов в надземной части сеянцев сосны (рис. 2, 3).

Для получения корректных результатов прежде всего необходимо было выделить на полученных гиперспектральных изображениях области, занятые растительными объектами, что осуществляли в два этапа (рис. 2). На первом этапе выделяли участок изображения, занятый растительным объектом, ориентируясь на значения индекса SI , высокие значения которого характерны для хлорофиллоносных тканей, в том числе — для надземной части сеянцев сосны (рис. 2А, см. также «Материалы и методы»). Далее из выбранных участков

исключали пиксели фона, используя характерные особенности спектров зеленых растений и спектрально-угловой классификатор пикселей изображения (рис. 2Б–Г).

Анализ распределений значений вегетационных индексов показал, что такие величины, как суммарное значение индексов, не являются информативными вследствие исходной гетерогенности размеров (проекционной площади) надземной площади сеянцев (данные не приводятся). Дополнительные сложности могут возникать из-за ограниченного пространственного разрешения использованного в работе изображающего гиперспектрометра, что может приводить к «смешиванию» спектральной информации о мелких дета-

лях растений (тонких хвоинках) и фоне в одном и том же пикселе изображения. Частично такие «смешанные» пиксели были удалены при исключении фона. Также следует отметить, что для снижения вклада шумов в значения коэффициентов отражения (возникающих, в частности, из-за вариации светотеневой обстановки во время съемки при естественном освещении) целесообразно использовать более широкие спектральные каналы (порядка 10 нм). В итоге значения вегетационных индексов были нормированы на проекционную площадь растений. Эта операция позволила рассчитать среднее удельное содержание хлорофиллов (рис. 3А) и каротиноидов на единицу проекционной площади надземной части растений.

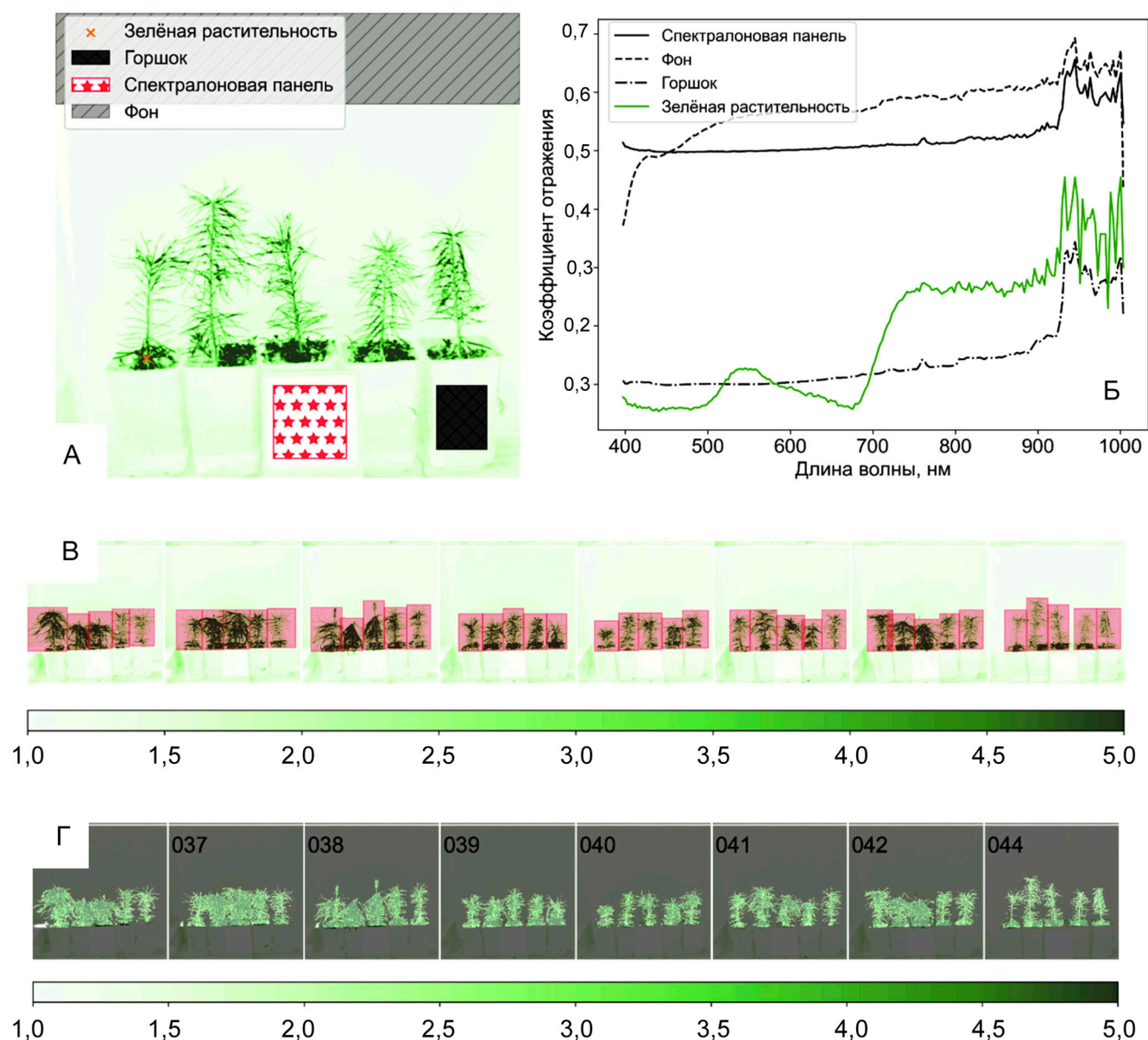


Рис. 2. Предварительная обработка гиперспектральных изображений — выделение областей, содержащих данные о растительных объектах. Показаны (А) области-источники эталонных спектров для спектрально-углового классификатора, (Б) эталонные спектры отражения растений и посторонних объектов на изображениях, репрезентативные изображения, на которых растения выделены ограничивающими прямоугольниками (В), а также итоговые изображения, из которых методом спектрально-угловой классификации исключен фон (Г).

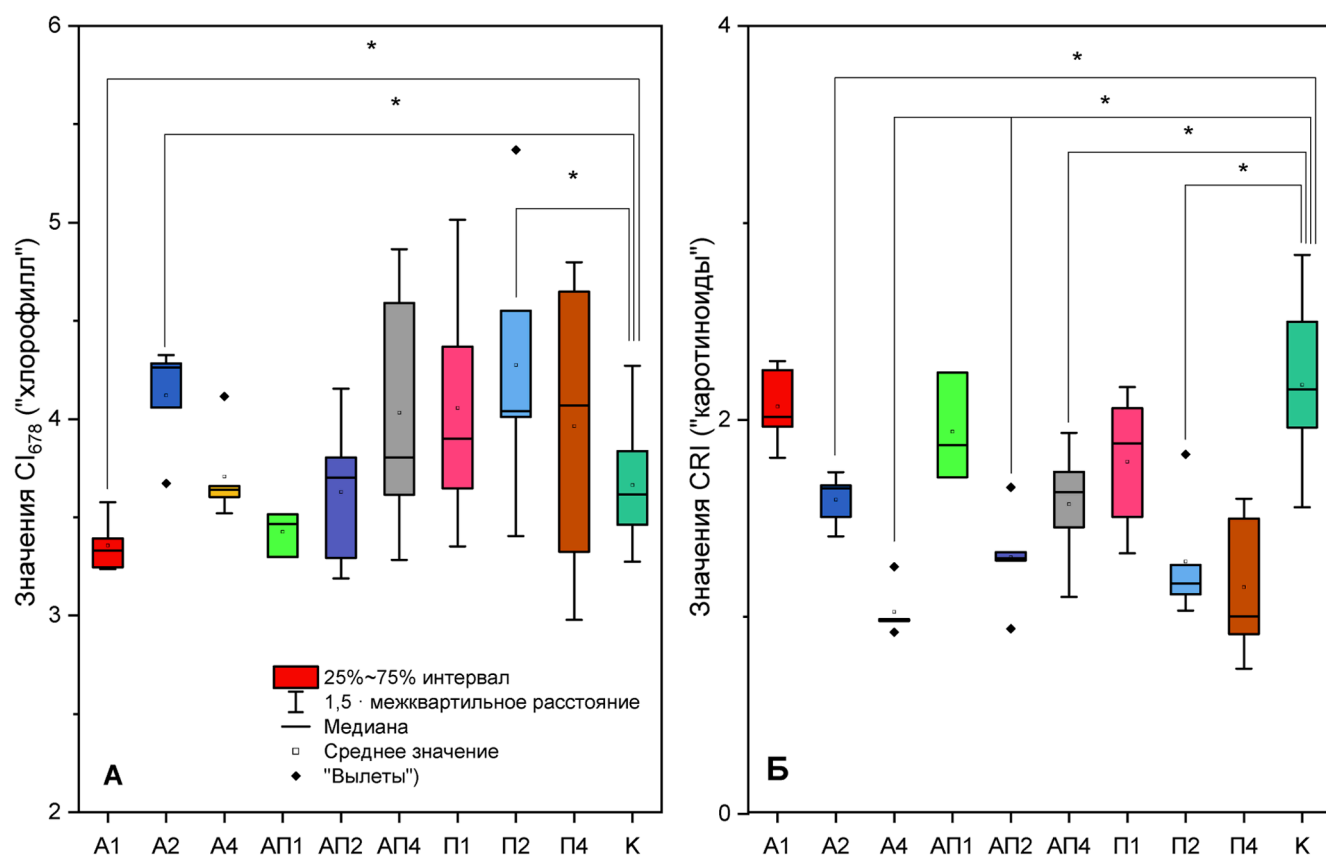


Рис. 3. Изменения оценки среднего удельного содержания суммы хлорофиллов (А) и каротиноидов (Б) в семенах сосны обыкновенной при выращивании в присутствии различных концентраций СЗР по результатам неинвазивного анализа с использованием гиперспектральных изображений. Обозначения см. в подписи к рис. 1.

В целом, результаты неинвазивной оценки соответствовали оценкам, независимо полученным прямыми измерениями (рис. 1): ни одно из экспериментальных воздействий не привело к резкому снижению содержания хлорофиллов по сравнению с контролем и, соответственно, не оказало значительного негативного влияния на рост и развитие семян сосны (рис. 3А). Обработка СЗР «Актара» в двукратной концентрации сопровождалась увеличением среднего удельного содержания хлорофилла приблизительно на 15%, тогда как при обработке в однократной и четырехкратной концентрации эффекты были слабо выраженными по сравнению с контролем. Во всех случаях обработка СЗР «Превикур Энерджи», в том числе при обработке в двукратной концентрации, вызвала рост среднего удельного содержания хлорофилла в растениях. В случае комбинированной обработки обоими СЗР максимальное повышение содержания хлорофилла наблюдали при обработке препаратами в четырехкратной концентрации.

Особого внимания заслуживают данные об изменении содержания каротиноидов, (рис. 3Б). В наших экспериментальных условиях среднее удельное содержание этих пигментов снижалось с повышением концентрации СЗР при обработке.

С одной стороны, этот эффект может свидетельствовать о возможной токсичности СЗР, реализующейся, в частности, через угнетение биосинтеза каротиноидов [29]. Однако наблюдаемое снижение содержания каротиноидов не сопровождалось снижением содержания хлорофиллов, а именно одновременное снижение содержания этих групп пигментов считается характерным признаком повреждения ассимиляционных тканей растений. Кроме того, снижение содержания каротиноидов на фоне роста содержания хлорофиллов обычно регистрируют при релаксации (деактивации) фотозащитных механизмов растений, требующих присутствия каротиноидов [30]. С учетом сказанного, наблюдаемый эффект, скорее всего, не отражает редукцию фотосинтетического аппарата, вызванную обработкой СЗР на фоне полива модельными карьерными сточными водами, а представляет собой проявление нормальных механизмов акклиматизации пигментного аппарата растений. Более точная интерпретация данных результатов потребует исследования функционального состояния (путем анализа амплитудно-кинетических характеристик индукционных кривых флуоресценции Хл *a*) и морфоструктурных особенностей фотосинтетического аппарата.

Заключение

Полученные результаты показали, что, несмотря на некоторые методические сложности съемки и количественной интерпретации гиперспектральных изображений, возможно их использование для неинвазивного дистанционного мониторинга состояния сеянцев хвойных растений в вегетационных экспериментах, в том числе — в полевых условиях. При этом для выборочного контроля результатов неинвазивных методов целесообразно использование традиционных прямых измерений. Также следует отметить, что подходы к анализу гиперспектральных данных о растениях с использованием вегетационных индексов остаются эффективными на фоне распространения альтернативных методов, основанных на алгоритмах машинного обучения [31], особенно при ограниченном объеме данных, доступных для обучения этих алгоритмов.

С применением как традиционных (прямых), так и дистанционных неинвазивных методов было установлено, что СЗР «Актара» и «Превикур Энерджи» в исследованных концентрациях не обладают острой токсичностью и не оказывают выраженного негативного влияния на темпы роста и пигментный состав сеянцев сосны обыкновенной, по крайней мере — в двухмесячный период наблюдений. При этом использование для полива этих растений растворов минеральных солей, имитирующих по составу основных компонентов карьерные сточные воды угольных разрезов, также не сопровождалось синергическими токсическими эффектами. Таким образом, не выявлено очевидных препятствий к применению вышеупомянутых СЗР

для профилактики и стоп-обработок сеянцев сосны обыкновенной, выращиваемых с поливом карьерными сточными водами, содержащими Fe, Zn и Mn (табл. 2, [9]). При этом следует учитывать, что длительность наблюдений в данном исследовании сравнительно невелика и для оценки более отдаленных во времени эффектов необходимы более длительные (многолетние) исследования. Желателен также мониторинг развития сеянцев после их высадки в антропогенно-нарушенных районах, требующих фиторемедиации.

Полученные результаты также свидетельствуют о перспективности использования локальных бросовых ресурсов (включая карьерные сточные воды, богатые элементами минерального питания, но не содержащие высокотоксичные тяжелые металлы, такие как Pb и Cd) при выращивании растений для фиторемедиации почв выработанных угольных разрезов. Локально доступные карьерные сточные воды могли бы использоваться в безотходной технологии биологической очистки и рекультивации почв, но прежде необходимо свести к минимуму риски, связанные с возможным накоплением тяжелых металлов в почве и/или в растениях, что требует более длительного экомониторинга.

Настоящее исследование выполнено при финансовой поддержке Кемеровского государственного университета (договор 374/2024/223). Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Работа выполнена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ray S., Dey K. Coal mine water drainage: the current status and challenges. *J. Inst. Eng. (India): Ser. D.* 2020;101(2):165–172.
2. Hudson-Edwards K.A., Jamieson H.E., Lottermoser B.G. Mine wastes: past, present, future. *Elements.* 2011;7(6):375–380.
3. Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. Heavy metal toxicity and the environment. *Mol. Clin. Environ. Toxicol.* 2012;3:133–164.
4. Lottermoser B.G. Recycling, reuse and rehabilitation of mine wastes. *Elements.* 2011;7(6):405–410.
5. Luptakova A., Ubaldini S., Macingova E., Fornari P., Giuliano V. Application of physical-chemical and biological-chemical methods for heavy metals removal from acid mine drainage. *Proc. Biochem.* 2012;47(11):1633–1639.
6. Sincero A.P., Sincero G.A. *Physical-chemical treatment of water and wastewater.* CRC press: Boca Raton; 2002. 856 pp.
7. Priya A.K., Jalil A.A., Vadivel S., Dutta K., Rajendran S., Fujii M., Soto-Moscoso M. Heavy metal remediation from wastewater using microalgae: recent advances and future trends. *Chemosphere.* 2022;305:135375.
8. Manikandan A., Suresh Babu P., Shyamalagowri S., Kamaraj M., Muthukumaran P., Aravind J. Emerging role of microalgae in heavy metal bioremediation. *J. Basic. Microbiol.* 2022;62(3–4):330–347.
9. Solovchenko A., Selyakh I., Semenova L., Scherbakov P., Zaytseva A., Zaytsev P., Fedorenko T., Alam M.A., Jingliang X., Lukyanov A., Lobakova E. A local or a stranger? Comparison of autochthonous vs. allochthonous microalgae potential for bioremediation of coal mine drainage water. *Chemosphere.* 2024;365:143359.
10. Singh N., Gupta V.K., Kumar A., Sharma B. Synergistic effects of heavy metals and pesticides in living systems. *Front. Chem.* 2017;5:70.
11. Alengebawy A., Abdelkhalek S.T., Qureshi S.R., Wang M.-Q. Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics.* 2021;9(3):42.
12. Kumar P., Singh J., Yadav V.K., Gautam K., Kumar M., Gupta R. Phenotyping in plant breeding using modern tools: a review. *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 2024;27(11):200–212.
13. Ferreira L.D.C., Carvalho I.C.B., Jorge L.A.C., Quezado-Duval A.M., Rossato M. Hyperspectral imaging

for the detection of plant pathogens in seeds: recent developments and challenges. *Front. Plant. Sci.* 2024;15:1387925.

14. Дейвис Ш.М., Ландгребе Д.А., Филлипс Т.Л., Ланженлауб Д.С., Сиева Л.Р.Ф., Свейн Ф.Х., Хоффер Р.М. Дистанционное зондирование: количественный подход. М.: Недра; 1983. 415 с.

15. Zavafer A., Bates H., Mancilla C., Ralph P.J. Phenomics: conceptualization and importance for plant physiology. *Trends Plant Sci.* 2023;28(9):1004–1013.

16. Watt M., Fiorani F., Usadel B., Rascher U., Muller O., Schurr U. Phenotyping: new windows into the plant for breeders. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2020;71(1):689–712.

17. Maraveas C. Image analysis artificial intelligence technologies for plant phenotyping: current state of the art. *AgriEngineering.* 2024;6(3):3375–3407.

18. Fu P., Meacham-Hensold K., Guan K., Wu J., Bernacchi C. Estimating photosynthetic traits from reflectance spectra: A synthesis of spectral indices, numerical inversion, and partial least square regression. *Plant Cell Environ.* 2020;43(5):1241–1258.

19. Perine J., Anderson J.C., Kruger G.R., Abi-Akar F., Overmyer J. Effect of nozzle selection on deposition of thiamethoxam in Actara® spray drift and implications for off-field risk assessment. *Sci. Tot. Environ.* 2021;772:144808.

20. Ekabote S.D., Divyajyothi U., Narayanaswamy P., Ravindra H. Evaluation of propamocarb 530+ fosetyl 310-840 SL for the management of damping off of vegetables. *J. Pharmacognos. Phytochem.* 2019;8(1):1616–1618.

21. Shurygin B., Chivkunova O., Solovchenko O., Solovchenko A., Dorokhov A., Smirnov I., Astashev M., Khort D. Comparison of the non-invasive monitoring of fresh-cut lettuce condition with imaging reflectance hyperspectrometer and imaging PAM-fluorimeter. *Photonics.* 2021;8(10):425.

22. Gitelson A., Solovchenko A. Non-invasive quantification of foliar pigments: possibilities and limitations of reflectance-and absorbance-based approaches. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2018;178:537–544.

23. Gitelson A., Solovchenko A. Generic algorithms for estimating foliar pigment content. *Geophys. Res. Lett.* 2017;44(18):9293–9298.

24. Horler D.N.H., Dockray M., Barber J. The red edge of plant leaf reflectance. *Int. J. Rem. Sens.* 2007;4(2):273–288.

25. De Carvalho O.A., Meneses P.R. Spectral correlation mapper (SCM): an improvement on the spectral angle mapper (SAM). *Summaries of the 9th JPL airborne earth science workshop, vol. 9. no. 2.* Pasadena: JPL publication; 2000:00–18.

26. Kruse F.A., Lefkoff A., Boardman J., Heidebrecht K., Shapiro A., Barloon P., Goetz A. The spectral image processing system (SIPS) — interactive visualization and analysis of imaging spectrometer data. *Rem. Sens. Environ.* 1993;44(2–3):145–163.

27. Ilija P. Previcur energy-advantages of the fungicide for the control of vegetable diseases. *Zbornik predavanj in referatov, 8. Slovenskega postvetovanja o varstvu Rastlin*, Ljubljana; 2007:59–64.

28. Solovchenko A., Dorokhov A., Shurygin B., Nikolenko A., Velichko V., Smirnov I., Khort D., Aksenov A., Kuzin A. Linking tissue damage to hyperspectral reflectance for non-invasive monitoring of apple fruit in orchards. *Plants.* 2021;10(2):310.

29. Rouchaud J., Moons C., Meyer J.A. Effects of pesticide treatments on the carotenoid pigments of lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 1984;32(6):1241–1245.

30. Solovchenko A. *Photoprotection in Plants: Optical Screening-based Mechanisms*. Heidelberg; N.Y.: Springer; 2010. 170 pp.

31. Shurygin B., Smirnov I., Chilikin A., Khort D., Kutyrev A., Zhukovskaya S., Solovchenko A. Mutual augmentation of spectral sensing and machine learning for non-invasive detection of apple fruit damages. *Horticulturae.* 2022;8(12):1111.

Поступила в редакцию 23.01.2025

После доработки 22.03.2025

Принята в печать 07.05.2025

RESEARCH ARTICLE

Hyperspectral monitoring of pesticide effects on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings irrigated with model coal mine wastewater

A.E. Solovchenko^{1,*} , B.M. Shurygin¹ , I.O. Selyakh¹ , L.R. Semenova¹ ,
P.N. Scherbakov¹ , O.B. Chivkunova¹ , A.A. Lukyanov¹ ,
E.S. Mikhailova², V.A. Kryuk² , E.S. Lobakova¹ 

¹ Department of Biology, Moscow State University, Leninskiye gory, 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Kemerovo State University, Institute of Nano-, Bio-, Information-, Cognitive- and Socio-humanitarian Technologies, Krasnaya str.6, Kemerovo, 625000 Russia

*e-mail: solovchenkoae@my.msu.ru

The treatment of quarry wastewater, as well as the reclamation of depleted coal mines, are serious environmental problems. One of the ways to solve them is phytoremediation using stress-resilient plants such as the common pine (*Pinus sylvestris* L.). To mitigate the risk of epiphytotics during mass cultivation, treatments with chemical pesticides are necessary. It is important to make sure that the pesticides do not harm plants when using quarry wastewater containing heavy metals for irrigation. In this regard, mass monitoring of plants by non-invasive methods is highly relevant. In this work, we used direct measurement methods and a non-invasive approach based

on hyperspectral imaging to comprehensively monitor the condition of pine seedlings treated with the “Aktara” and “Previcur Energy” pesticides in different concentrations (single, double, and quadruple compared to the concentration recommended by the manufacturer) and irrigated with the solutions of mineral salts simulating the wastewater from coal mines. It is shown that, despite some methodological difficulties, it is possible to use hyperspectral images for non-invasive remote monitoring of the condition of coniferous seedlings in vegetation experiments, including in the field. It was found that the pesticide treatments exerted neither acute toxicity nor a pronounced negative effect on the growth rate and pigment composition of the pine seedlings during the two-month observation. At the same time, irrigation of these plants with model quarry wastewater also did not produce synergistic toxic effects. Thus, there are no obvious obstacles to the use of the above-mentioned pesticides for treatment of Scots pine seedlings irrigated with quarry wastewater containing Fe, Zn and Mn. The results obtained also support the use of wastewater rich in mineral nutrition elements but lacking highly toxic heavy metals (such as Pb and Cd), when growing plants for phytoremediation of soils from depleted coal mines. However, long-term, preferably multi-year studies are needed to assess long-term risks.

Keywords: *proximal sensing, phytoremediation, vegetation indices, pesticides, heavy metals, microalgae*

Funding: This research was partly funded by Kemerovo State University (project 374/2024/223).

Сведения об авторах

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

Шурыгин Борис Михайлович — канд. биол. наук, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: shu_b@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9650-3523>

Селях Ирина Олеговна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: i_savelyev@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3885-0898>

Семенова Лариса Ратмировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: semelar@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9520-6743>

Щербаков Павел Николаевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: cyano@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5123-9754>

Чивкунова Ольга Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: olga.chivkunova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1625-4510>

Лукьянов Александр Андреевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: loockart@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2900-1053>

Михайлова Екатерина Сергеевна — канд. хим. наук, директор Института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных технологий Кемеровского государственного университета. Тел.: 8-3842-58-05-04; e-mail: e_s_mihaylova@mail.ru

Крюк Виктория Алексеевна — мл. науч. сотр. Института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных технологий Кемеровского государственного университета. Тел.: 8-3842-58-05-04; e-mail: Vika.kryuk.95@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5969-948X>

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 612.115.3+615.273.52

Корригирующее действие хитозана на параметры гемостаза в условиях гипокоагуляции, вызванной антиагрегантом клопидогрелем

Л.А. Ляпина^{id}, М.Е. Григорьева^{id}, Т.Ю. Оберган^{*}^{id}, Т.А. Шубина^{id}

Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова, кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: tobergan@mail.ru

Изучалось действие хитозана в условиях *in vitro* на плазме крови здоровых крыс и крыс с приобретенной кровоточивостью, вызванной применением антиагреганта клопидогреля, необратимо ингибирующего P2Y₁₂-рецепторы тромбоцитов. Показана независимость степени прокоагулянтной активности хитозана от времени инкубации (5 и 30 мин при 37°C) при добавлении его к пулу плазмы крови от здоровых животных. Однако при этом отмечено значительное снижение (на 27%) фибриндеполимеризационной активности плазмы крови, которая еще более подавляется (на 42%) с увеличением времени инкубации. При добавлении хитозана к гипокоагуляционной плазме, полученной после перорального введения крысам клопидогреля (однократно, перорально в дозе 5 мг/кг) и инкубации в течение 5 мин, установлена резко выраженная активация свертываемости крови, о чем свидетельствовали повышенные значения концентрации фибриногена (на 37%), полимеризации фибрина (на 51%) и агрегации тромбоцитов (на 36%) при одновременном значительном снижении фибриндеполимеризационной активности крови (на 47%). При удлинении времени инкубации гипокоагуляционной плазмы с хитозаном наблюдались более выраженные эффекты этого препарата, что проявлялось в значительном повышении концентрации фибриногена, агрегации тромбоцитов, степени полимеризации фибрина и снижении тромбинового времени, характеризующего общий путь свертывания крови. Итак, кровоостанавливающий препарат хитозана приводит к блокаде явлений кровоточивости, вызываемой применяемым в клинике клопидогрелем, что впервые показано в данной работе.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, гипокоагуляция, клопидогрель, полимеризация фибрина, система гемостаза, фибринстабилизирующий фактор, хитозан

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-5

Список сокращений:

PDGF-AB – производное от тромбоцитов фактора роста-AB (Platelet-derived growth factor AB);
 TGF-β1 – трансформирующий фактор роста-β1 (Transforming growth factor β1);
 АТ – агрегация тромбоцитов;
 АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время;
 ГКП – гипокоагуляционная плазма;
 ПФ – полимеризация фибрина;
 ТВ – тромбиновое время;
 FIX – фактор свертывания IX;
 FXIIIa – фактор свертывания XIIIa;
 ФДПА – фибриндеполимеризационная активность;
 ХТЗ – хитозан.

Введение

Одной из актуальных проблем современной физиологии и медицины является коррекция нарушений свертываемости крови, обусловленных или тромбообразованием, или кровоточивостью. Для борьбы с гиперкоагуляцией используют хорошо известные антикоагулянты, антиагреганты и фибринолитики, тогда как для устранения явлений кровоточивости применяют достаточно ограниченное количество лечебных средств. Однако тяжелые вирусные инфекции, хирургические и нехирургические травмы и многие другие патологии, а также ранения в условиях чрезвычайных ситуаций потенциально опасны в плане развития серьезных геморрагических нарушений, что требует поиска новых природных нетоксичных кровооста-

навливающих препаратов направленного и быстрого действия. Были разработаны новые гемостатические материалы на основе полисахаридов (хитозан, гиалуроновая кислота, альгинат, целлюлоза, циклодекстрины, крахмал, декстран и каррагинан), пептидов (самосборные пептиды) и белков (фиброин шелка, коллаген, желатин, кератин и тромбин). Эти новые материалы демонстрируют высокую гемостатическую эффективность благодаря активации различных механизмов в системе гемостаза [1]. Кровоостанавливающие полисахаридные средства широко используются для лечения не только наружных и внутренних кровотечений, но и массивных кровоизлияний [2].

В последнее время все большее внимание уделяется биополимерам на основе хитозана как биологически активным веществам с высокими кровоостанавливающими свойствами. Хитозан представляет собой полисахарид, полученный из хитина ракообразных, обладает широким спектром биологических активностей, в том числе гемостатической, а также хорошей биосовместимостью, биоразлагаемостью и нетоксичностью [3, 4]. Он применяется в биомедицине, сельском хозяйстве и фармацевтической промышленности, в том числе в области лекарственных средств, продуктов питания, косметики, биоматериалов и тканевой инженерии [5]. По сравнению с другими доступными полисахаридами хитозан обладает низкой молекулярной массой, более высокой степенью дезацетилирования и полимеризации, что наделяет его уникальными биологическими эффектами, такими как антимикробные, антиоксидантные, противоопухолевые, противовоспалительные, антибактериальные и антигипертензивные, а также способностью к доставке лекарств. Кроме того, он проявляет антидиабетическое и гипохолестеринемическое, а также направленное против ВИЧ-1 и болезни Альцгеймера действие в организме. Вследствие более высокой клеточной трансдукции хитозан полностью всасывается через кишечный эпителий благодаря своей катионной сфере, экспонируемой на более коротких N-глюкозаминовых единицах [6]. В настоящее время очень активно используют хитозановые повязки для местного применения. Продemonстрировано, что повязка из хитозана является как прокоагулянтом, так и эффективным противомикробным средством, способствуя заживлению ран [7]. Хитозан и его производные стали актуальными темами исследований в области производства гидрогелевых повязок для ран благодаря их уникальной молекулярной структуре и разнообразной биологической активности. По сравнению с традиционными средствами, такими как марля и бинт, гидрогель способен поглощать и удерживать больше воды, не растворяясь и не теряя своей трехмерной структуры, что позволяет избежать вторичного повреждения и способствует заживлению ран [8].

Отмечается, что местные методы лечения перооперационных кровотечений при гемофилии в настоящее время ограничены фибриновыми клеями. Недостатки фибриновых клеев включают риск заражения патогенами, переносимыми через кровь и перекрестную иммунологическую реакцию на факторы II и V. Хотя местные гемостатические средства доступны для лечения травматических кровотечений в полевых условиях военными и специалистами скорой медицинской помощи, их эффективность для лечения кровотечений при гемофилии, нарушениях тромбоцитарной системы, хирургических вмешательствах и для лечения других дефектов гемостаза, наблюдаемых при циррозе и других заболеваниях печени, а также при передозировке антикоагулянтной терапии, не изучалась. Новый гранулированный гемостатик из смектита WoundStat™ продемонстрировал 100%-ную эффективность в обеспечении гемостаза при травматическом артериальном кровотечении под высоким давлением и был разрешен для наружного применения в случаях кровотечений средней и тяжелой степени [9].

Перспективным является применение наночастиц хитозана при гемофилии В, вызванной дефицитом фактора свертывания IX (ФІХ). При исследовании пероральной доставки генов на основе катионного биополимера хитозана было показано, что наночастицы хитозана защищают инкапсулированную ДНК от переваривания в желудочно-кишечном тракте и усиливают усвоение в кишечнике за счет улучшения транс- и параклеточной проницаемости кишечника и ее мукоадгезивных свойств [10].

В других работах указывается на применение хитозановых прокладок у пациентов, находящихся на хроническом гемодиализе, когда часто развивается коагулопатия, которая может усилить кровотечение из места прокола после извлечения иглы. Сообщалось, что прокладки на основе хитозана ускоряют гемостаз даже при наличии коагулопатии [11].

Сообщается об эффективности системы, включающей хитозан (иммобилизованный тромбин на рентгеноконтрастных эмболических микросферах из поливинилового спирта/хитозана), для точной локализации и местного свертывания крови при артериальной эмболизации. Эта система может действовать как рентгеноконтрастный и гемостатический эмболический агент для повышения эффективности эмболизации [12].

Известно, что хитозан относится к кровоостанавливающим препаратам, свойства которого зависят от структуры, молекулярной массы, степени дезацетилирования и сульфатирования [13, 14]. Один из механизмов кровоостанавливающего действия хитозана обусловлен связыванием его положительно заряженных групп с отрицательно заряженными эритроцитами с образованием гелеобразного сгуст-

ка в месте контакта с кровью [15]. Изучено влияние хитозана с различной молекулярной массой на структуру и функцию свертывающих белков плазмы крови и показано, что он образует комплексы с фибриногеном за счет электростатического притяжения, при этом структура и конформация фибриногена изменяются [3, 16]. Кроме того, хитозан способен взаимодействовать с низкомолекулярным гепарином, для чего важны его степень деполимеризации и молекулярная масса [17]. Установлено, что хитозан обладает умеренной прокоагулянтной активностью при введении в организм, поскольку не выявлено его значительного влияния на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [16, 18, 19]. Также хитозан в определенной мере понижает риск гемолиза в зависимости от дозы и молекулярной массы, при его высокой концентрации наблюдается необратимая агрегация тромбоцитов [18]. Изменения параметров тромбоэластограммы под действием хитозана демонстрируют сдвиг процесса свертывания крови в сторону гиперкоагуляции [16].

Ранее в наших экспериментах было показано, что в условиях *in vitro* и при пероральном введении хитозана здоровым животным наблюдается усиление свертываемости крови за счет повышения агрегационной функции тромбоцитов, снижения фибринолитического потенциала крови и возрастания степени полимеризации фибрина [19, 20]. Многие авторы подтверждают, что хитозан активирует свертываемость крови человека, слабо влияя на контактную фазу свертывания крови, незначительно и кратковременно активируя систему комплемента и не оказывая действия на внутренний путь каскада коагуляции [21]. Однако при прямом контакте хитозана с кровью могут возникать воспалительные реакции, что ограничивает его использование в случае системного введения, тогда как при местном применении такие побочные эффекты отсутствуют [22].

До настоящего времени механизмы действия хитозана на свертывание крови при гипокоагуляции, вызванной некоторыми лекарственными препаратами, до сих пор остаются неясными. Известно, что терапия антикоагулянтами и антиагрегантами с высокой долей вероятности может приводить к возникновению эпизодов кровоточивости в организме. При этом риск геморрагических осложнений существенно возрастает при длительном и бесконтрольном применении антитромботических препаратов, а также при их передозировке.

Один из известных применяемых в клинике антиагрегантов — клопидогрель — относится к классу тиенопиридинов. Он ингибирует агрегацию тромбоцитов, вызывая необратимые изменения в рецепторе P2Y₁₂, а также является препаратом, механизм действия которого заключается в снижении экспрессии гликопротеина IIb/IIIa,

рецептора фибриногена на поверхности тромбоцитов [23]. При этом происходят снижение ингибирующего действия активатора агрегации тромбоцитов АДФ на аденилатциклазу, уменьшение высвобождения биологически активных веществ из гранул тромбоцитов, блокада связывания фибриногена с рецептором тромбоцитов гликопротеином IIb/IIIa [24].

Уникальные биологические свойства и преимущества препаратов на основе хитозана, такие как стабильность, длительный срок хранения и полная растворимость в воде, делают представителей данного класса биологических веществ перспективными для дальнейшего изучения и создания новых средств, оказывающих влияние на процессы гемостаза. Однако необходимо учитывать, что детальное исследование влияния хитозана и препаратов на его основе на систему свертывания крови в условиях пониженной свертываемости крови остается актуальным.

Цель настоящей работы заключается в исследовании влияния хитозана на параметры системы гемостаза и изучении его корригирующего коагулянтного эффекта в условиях моделирования у крыс гипокоагуляции, вызванной широко применяемым в клинической практике антиагрегантом клопидогрелем с известным механизмом действия.

Материалы и методы

В работе использовали сублимированный водорастворимый хитозан (сукцинил хитозана; ООО «Биопрогресс», Россия) и препарат с антиагрегационным действием — клопидогрель (Actavis Group, Мальта), которые перед употреблением растворяли в 0,85%-ном растворе NaCl (ООО «Мосфарм», Россия).

Дизайн исследования. Эксперименты были проведены в условиях *in vitro* с использованием пула плазмы от 20 половозрелых лабораторных белых крыс-самцов Wistar массой 250–280 г, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (Московская обл., Россия). Содержание животных и все экспериментальные процедуры соответствовали международным биоэтическим нормам.

В *первой серии* опытов исследовали влияние хитозана на параметры гемостаза при его добавлении к пулу нормальной плазмы и дальнейшей инкубации образцов в течение 5 или 30 мин (для выявления оптимального временного интервала инкубации). Схема эксперимента представлена на рис. 1А.

К образцам пулированной плазмы (0,1 мл) добавляли 0,05 мл раствора хитозана (10 мг/мл) или физиологического раствора в качестве контроля, инкубировали смесь при 37°C в течение либо 5 мин, либо 30 мин, а затем проводили определение параметров гемостаза.

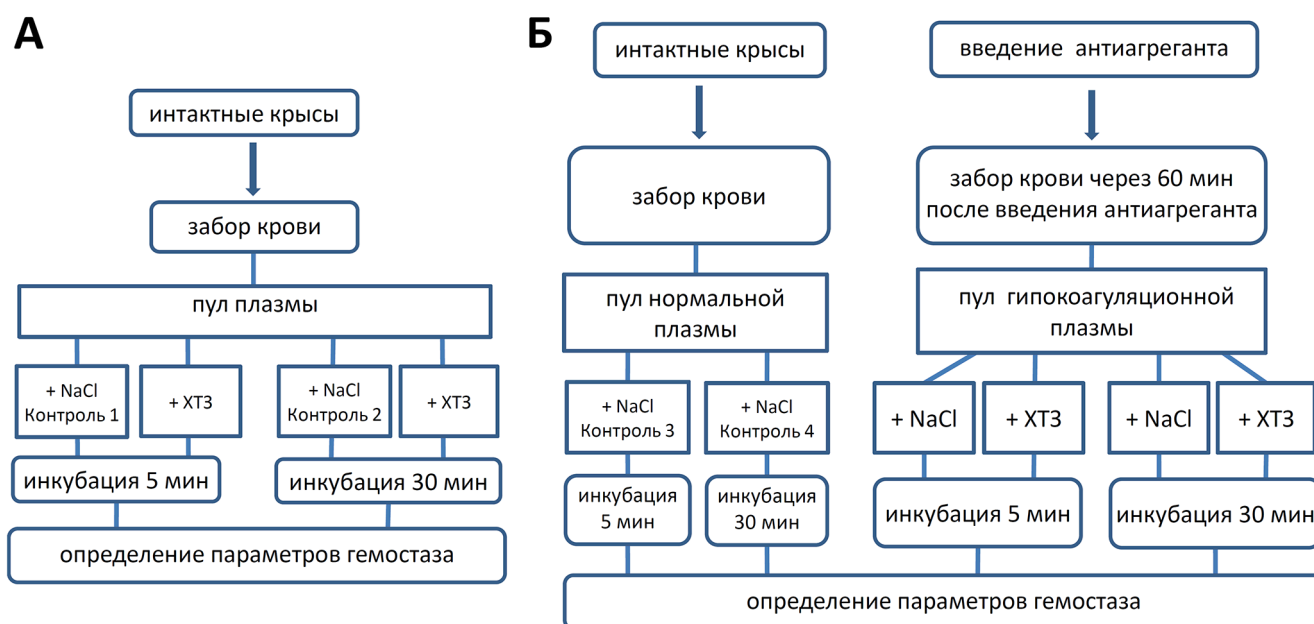


Рис. 1. Схема проведения (А) первой и (Б) второй серии экспериментов. NaCl – физиологический раствор, ХТЗ – хитозан.

Были использованы следующие экспериментальные группы: 1) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 5 мин (группа «Контроль 1»); 2) пул нормальной плазмы с добавлением хитозана (группа «ХТЗ»), инкубация 5 мин (группа «ХТЗ-5»); 3) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 30 мин (группа «Контроль 2»); 4) пул нормальной плазмы с добавлением хитозана, инкубация 30 мин (группа «ХТЗ-30»).

Вторую серию опытов проводили с использованием пула гипокоагуляционной плазмы. Как показано на рис. 1Б, для создания эффекта пониженного свертывания в крови животных использовали препарат, уменьшающий агрегацию тромбоцитов (клопидогрель, однократно, перорально в дозе 5 мг/кг). Затем к 0,1 мл пулированной плазмы крови добавляли 0,05 мл раствора хитозана в концентрации 10 мг/мл или физиологического раствора (в качестве контроля), инкубировали при 37°C в течение либо 5 мин, либо 30 мин, перемешивая образцы каждые 5 мин, а затем выполняли биохимические исследования. В этой серии экспериментов также использовали плазму нормальных здоровых животных, которым за 1 ч до забора крови вместо клопидогреля вводили эквивалентный объем 0,85%-ного NaCl.

Были использованы следующие экспериментальные группы: 1) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 5 мин (группа «Контроль 3»); 2) пул нормальной плазмы с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 30 мин (группа «Контроль 4»); 3) пул гипокоагуляционной плазмы (ГКП) с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 5 мин (группа «ГКП + NaCl-5»);

4) пул ГКП с добавлением хитозана, инкубация 5 мин (группа «ГКП + ХТЗ-5»); 5) пул ГКП с добавлением 0,85%-ного NaCl, инкубация 30 мин (группа «ГКП + NaCl-30»); 6) пул ГКП с добавлением хитозана, инкубация 30 мин (группа «ГКП + ХТЗ-30»).

Оценка состояния системы гемостаза. Забор крови у наркотизированных животных (внутрибрюшинное введение 2%-ного раствора ксилазина (Alfasan International B.V., Нидерланды) в количестве 0,2 мл/кг массы тела) и в первой, и во второй серии экспериментов осуществляли из яремной вены (*venae jugularis*) с консервантом 3,8%-ным раствором цитрата натрия (соотношение кровь/консервант = 9/1). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы образцы крови центрифугировали при 1000g в течение 5 мин, а для получения бедной тромбоцитами плазмы – при 3000g в течение 12 мин. После центрифугирования собирали пул плазмы, с которым в дальнейшем проводили исследования.

В образцах бедной тромбоцитами пулированной плазмы определяли концентрацию фибриногена по Клауссу и тромбиновое время (ТВ) с применением стандартных наборов реактивов («Технология-Стандарт», Россия) на анализаторе свертывания крови АСК-2-02-Астра (Россия) и активность фибринстабилизирующего фактора свертывания XIIIa (ФХIIIa) с использованием набора реактивов согласно инструкции производителя (НПО «Ренам», Россия).

Фибринолитическую активность хитозана в условиях *in vitro* оценивали по тестам полимеризации фибрина и фибриндеполимеризационной (или неферментативной) фибринолитической

активности. Фибриндеполимеризационную активность (ФДПА), т.е. способность исследуемого препарата лизировать нестабилизированные ФХПА фибриновые пленки, определяли стандартным способом на пластинах нестабилизированного фибрина, которые готовили с использованием 0,2%-ного раствора фибриногена («Технология Стандарт», Россия) и 0,4%-ного раствора тромбина (Behring, Германия). Фибриновые пластины с нанесенными образцами инкубировали в течение 2 ч при 37°С. После инкубации измеряли зоны лизиса (ФДПА). Расчет степени полимеризации фибрина (ПФ) производили по формуле: $(L_k / L_o) \times 100\%$, где L_k – размер зоны лизиса после инкубации плазмы с физиологическим раствором (контроль), L_o – размер зоны лизиса после инкубации плазмы с хитозаном (опыт).

Исследование агрегации тромбоцитов (АТ) проводили методом Борна на лазерном агрегометре «АЛАТ-2 ЛА 220» (НПФ «Биола», Россия), используя в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Образцы плазмы крови (0,3 мл), обогащенной тромбоцитами, инкубировали с исследуемыми соединениями, затем вносили АДФ (0,05 мл). Определяли агрегацию тромбоцитов в течение 5 мин (за 100% принимали светопропускание плазмы, обедненной тромбоцитами).

Для всех образцов проводили параллельные эксперименты (не менее трех повторов) по каждому методу исследования. В качестве контроля использовали пробы, которые не содержали хитозан.

Исследование всех параметров системы гемостаза проводили согласно стандартным коагулологическим методам [25].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Подчинение данных закону нормального распределения проверяли по тесту Шапиро-Уилка. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое (М) и стандартную ошибку среднего (m). Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали

методом однофакторного дисперсионного анализа с последующими апостериорными сравнениями (тест Ньюмена-Кейлса). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Первая серия экспериментов. Показатели гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана к плазме крови здоровых крыс. Как видно из данных табл. 1 и рис. 2, в опытных образцах плазмы крови после добавления хитозана наблюдалась повышенная свертываемость крови по сравнению с контрольными значениями (добавление к пулу плазмы крови физиологического раствора). На это указывало снижение ФДПА, ТВ и повышение АТ, активности фактора XIIIa и ПФ. При этом ФДПА уменьшалась на 27% и 42%, а ТВ – на 18% и 23% при инкубации пула плазмы с хитозаном в течение 5 или 30 мин соответственно. Одновременно происходило увеличение ПФ, активности ФХIIIa и АТ на 30, 28 и 46% (при инкубации хитозана с пулом плазмы в течение 5 мин) и на 35, 13 и 25% (инкубация 30 мин) соответственно по сравнению с контролем. Следует отметить, что концентрация фибриногена в этих условиях практически не изменялась при выбранных временных интервалах инкубации.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о независимости степени прокоагулянтной активности хитозана от времени инкубации. Однако можно отметить, что с увеличением времени инкубации наблюдалось снижение ФДПА (неферментативной фибринолитической активности) плазмы крови.

Вторая серия экспериментов. Параметры гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана к плазме крови при моделировании у крыс гипокоагуляции, вызванной введением антиагреганта клопидогреля. Через 60 мин после перорального введения клопидогреля в крови крыс группы «ГКП + NaCl-5» отмечалось снижение свертывающего потенциала крови, о чем свидетельствовало удлинение ТВ на 21%, а также снижение концентрации фибриногена на 26% и АТ на 23% по сравнению с соответствующими

Таблица 1

Параметры гемостаза в условиях *in vitro* при добавлении хитозана или физиологического раствора к плазме интактных крыс (М ± m)

Группы	ФХIII, ед/мл	Концентрация фибриногена, г/л	ТВ, с	АТ, % светопропускания
<i>Инкубация 5 мин</i>				
NaCl-5 (Контроль 1)	124,8 ± 5,6	3,7 ± 0,3	15,2 ± 0,5	11,3 ± 0,9
ХТ3-5	159,2 ± 4,4**	3,6 ± 0,2	12,5 ± 0,8*	16,5 ± 0,8**
<i>Инкубация 30 мин</i>				
NaCl-30 (Контроль 2)	152,1 ± 4,1	3,1 ± 0,3	19,6 ± 0,9	13,9 ± 0,7
ХТ3-30	172,6 ± 5,1*	2,9 ± 0,2	15,1 ± 0,6**	17,4 ± 1,4*

Примечание: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 1 (добавление физиологического раствора, инкубация 5 мин) или Контролем 2 (добавление физиологического раствора, инкубация 30 мин) соответственно. ФХIII – фактор XIII, ТВ – тромбиновое время, АТ – агрегация тромбоцитов, ХТ3 – хитозан.

ющими показателями у здоровых животных (Контроль 3) (табл. 2). Как видно на рис. 3А, при инкубации ГКП с хитозаном в течение 5 мин (группа «ГКП + ХТЗ») установлено подавление ФДПА на 44% относительно соответствующих значений в Контроле 3. При этом увеличились показатели активности ФХIIа на 34% и степени ПФ — на 45%, что указывало на активацию процессов свертывания крови. При сравнении групп «ГКП + ХТЗ-5» и «ГКП + NaCl-5» выявлены значимые различия по следующим параметрам: ФДПА была снижена на 47%, а ПФ, ФХIIа, концентрация фибриногена и АТ возросли на 51, 16, 37 и 36% соответственно. При увеличении времени инкубации образцов ГКП с хитозаном до 30 мин в исследуемых пробах наблюдалась еще более значительная гиперкоагуляция: ФДПА и ТВ уменьшились на 63 и 23%, а степень ПФ и концентрация фибриногена повысились на 63 и 56% соответственно, по сравнению

с Контролем 4. Сравнение групп «ГКП + NaCl-30» и «ГКП + ХТЗ» выявило значимые различия по следующим значениям: ФДПА и ТВ снизились на 65 и 36%, а ПФ, ФХIIа, концентрация фибриногена и АТ увеличились на 92, 20, 128 и 35% относительно соответствующих показателей в группе «ГКП + NaCl-30» (рис. 3Б).
Итак, при добавлении хитозана к ГКП отмечалась выраженная активация свертываемости крови, о чем свидетельствовали повышенные значения концентрации фибриногена, степени полимеризации фибрина и АТ при одновременном значительном снижении ФДПА крови. При удлинении времени инкубации ГКП с хитозаном наблюдались более выраженные эффекты этого препарата, что выражалось в еще более значительном повышении концентрации фибриногена, АТ, степени ПФ и снижении ТВ, характеризующего общий путь свертывания крови.

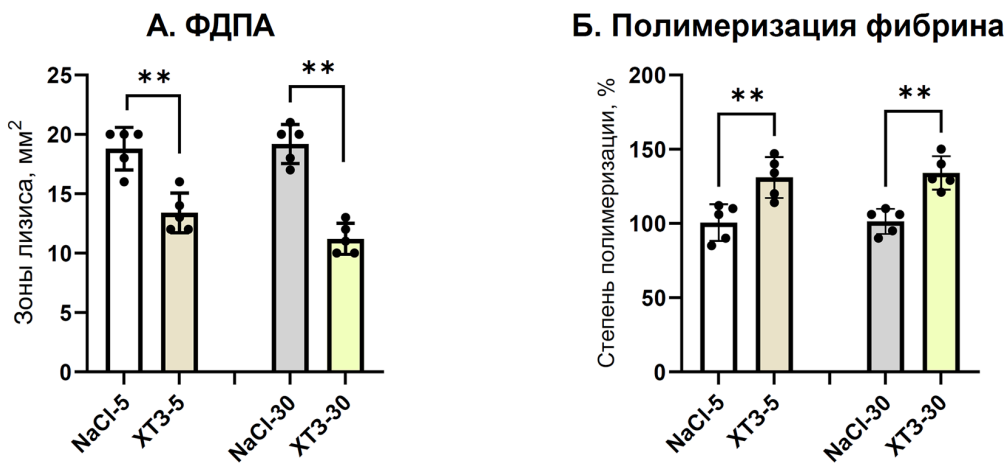


Рис. 2. Фибриндеполимеризационная активность и полимеризация фибрина в условиях *in vitro* при добавлении физиологического раствора или хитозана к плазме интактных крыс с последующей инкубацией образцов в течение 5 мин (А) и 30 мин (Б). Обозначения: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 1 (добавление физиологического раствора, инкубация 5 мин) или Контролем 2 (добавление физиологического раствора, инкубация 30 мин) соответственно. ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ПФ – полимеризация фибрина, ХТЗ – хитозан.

Таблица 2

Параметры гемостаза в условиях <i>in vitro</i> при добавлении хитозана или физиологического раствора к плазме крыс с гипокоагуляцией (М ± m)				
Группы	ФХII, ед/мл	Концентрация фибриногена, (г/л)	ТВ, с	АТ, % светопропускания
Инкубация 5 мин				
Нормальная плазма + NaCl-5 (Контроль 3)	132,5 ± 8,6	2,7 ± 0,4	11,4 ± 0,1	16,1 ± 0,9
ГКП + NaCl-5	153,3 ± 8,2	1,74 ± 0,2*	13,8 ± 0,7*	12,4 ± 0,9*
ГКП + ХТЗ-5	178 ± 4,1**, ##	2,4 ± 0,2#	13,5 ± 0,1	16,9 ± 1,5 **
Инкубация 30 мин				
Нормальная плазма + NaCl-30 (Контроль 4)	148,5 ± 4,6	2,36 ± 0,4	11,5 ± 0,2	15,8 ± 0,8
ГКП + NaCl-30	169,0 ± 5,4	1,62 ± 0,3*	13,5 ± 0,5#	11,7 ± 0,5*,#
ГКП + ХТЗ-30	185,3 ± 3,4*, ##	3,7 ± 0,3*, ##	8,7 ± 1,7**, ##	15,9 ± 0,8**, ##

Примечание: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 3 (нормальная плазма, инкубация 5 мин) или Контролем 4 (нормальная плазма, инкубация 30 мин) соответственно; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – различия статистически значимы между группами «ГКП + NaCl» и «ГКП + ХТЗ». ФХII – фактор XII, ТВ – тромбиновое время, ГКП – гипокоагуляционная плазма, ХТЗ – хитозан.

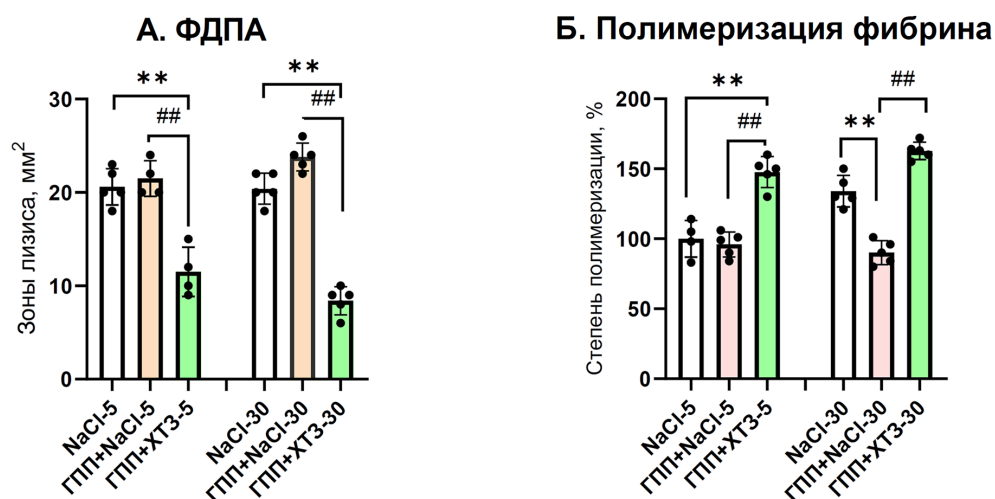


Рис. 3. Фибриндеполимеризационная активность и полимеризация фибрина в условиях *in vitro* при добавлении физиологического раствора или хитозана к ГПП с последующей инкубацией образцов в течение 5 мин (А) и 30 мин (Б).

Обозначения: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с Контролем 3 (нормальная плазма, инкубация 5 мин) или Контролем 4 (нормальная плазма, инкубация 30 мин) соответственно; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – различия статистически значимы между группами «ГПП + NaCl» и «ГПП + ХТЗ». ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ПФ – полимеризация фибрина, ГПП – гипокоагуляционная плазма, ХТЗ – хитозан.

Обосновывая новизну полученных результатов, следует отметить, что многочисленные работы по хитозану свидетельствуют о необходимости изучения средств на его основе и их механизма действия.

В данном исследовании нами впервые изучены эффекты природного полисахарида хитозана на показатели системы гемостаза при добавлении к плазме со сниженной свертывающей способностью, условно названной в данном исследовании «гипокоагуляционная» и полученной после перорального введения крысам антиагреганта клопидогреля. Известно, что хитозан относится к кровоостанавливающим препаратам, свойства которого зависят от структуры, молекулярной массы, степени дезацетилирования и сульфатирования [13, 14]. Ранее в наших работах было показано, что прокоагулянтная активность хитозана возрастает при увеличении его концентрации [19]. В настоящей работе была выбрана концентрация хитозана, вызывающая максимальный коагуляционный эффект. Показано, что на фоне нарушений свертывания крови в сторону гипокоагуляции добавление хитозана к плазме приводит к обратному эффекту, а именно, повышению агрегационной функции тромбоцитов, полимеризации фибрина, концентрации фибриногена, снижению уровня фибринолиза (по данным ФДПА) и ТВ. Подобные эффекты наблюдали и другие исследователи, оценивая влияние хитина и хитозана на свертываемость крови и агрегацию тромбоцитов крови собак [26]. Хитозан при этом усиливал высвобождение производного от тромбоцитов фактора роста-AB (Platelet-derived growth factor AB, PDGF-AB) и трансформирующего фактора роста-β1 (Transforming growth factor β1, TGF-β1). По данным ряда исследователей хитозан и фибриноген могут образовывать ком-

плексы главным образом за счет электростатического притяжения, вследствие чего структура и конформация фибриногена изменяются под действием хитозана [16]. Кроме того, присутствие хитозана мало влияет на значения АЧТВ, но вызывает значительные нарушения в процессе свертывания крови, изменяя параметры тромбоэластограммы. На слабую временную активацию системы комплемента и отсутствие активации внутреннего пути свертывания (по параметрам АЧТВ) под действием хитозана сообщается и в других исследованиях [21]. В других исследованиях на модели терапевтически антикоагулированных (гепаринизированных) кроликов было изучено местное применение хитозана на язычные разрезы и показано сокращение времени внутриротового кровотечения. Авторы предполагают, что гемостатические эффекты хитозана были обусловлены его взаимодействием с эритроцитами, что приводило к их связыванию с образованием гемостатической пробки [27].

По современным представлениям свертывание крови является единым процессом, связанным с гемостатическими реакциями не только тромбоцитов, но и различных плазменных факторов. Однако именно тромбоциты играют важнейшую роль в начальном этапе остановки кровотечений. Это обусловлено тем, что, благодаря их сложному рецепторному аппарату, тромбоциты способны участвовать в активации не только первичного, но и вторичного (или плазменного) гемостаза, влияя на коагуляционные факторы плазмы крови, что и наблюдалось в нашем исследовании при действии хитозана. Механизм агрегационного процесса в значительной степени определяется присутствием на мембране тромбоцитов специализированных рецепторов, которые участвуют не-

посредственно в процессе их агрегации [28]. Клопидогрель подавляет агрегацию тромбоцитов, необратимо связываясь с пуриновыми рецепторами P2Y₁₂, что нарушает процесс активации и агрегации тромбоцитов и приводит к изменению взаимодействия фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами P_{1b}/P_{1a} [29]. Ранее в наших работах было показано, что хитозан обладает значительным агрегационным эффектом [30] и механизм его действия, вероятно, может быть связан с мобилизацией кальция и активацией рецепторов P_{1b}/P_{1a} на поверхности тромбоцитов [28]. По результатам настоящего исследования можно предположить, что хитозан вмешивается во взаимодействие тромбоцитов с факторами свертывания, в том числе, с фибриногеном и фибрином, с которыми он может образовывать комплексы за счет электростатического взаимодействия [16]. В результате этого структура и конформация фибриногена изменяются под действием хитозана, что в данных условиях позволяет организму вернуться к нормальному состоянию системы гемостаза [31, 32]. По мере развития знаний о физиологии свертывания крови и патофизиологии предлагаемые средства против кровоточивости продолжают совершенствоваться. Новые знания о гемостатических средствах в арсенале клиницистов помогают расширить возможности и границы оказания жизненно необходимой помощи. Дальнейшее развитие исследований по физиологии свертывания крови и понимание механизмов процесса кровотечений будет способствовать появлению безопасных и эффективных гемостатических средств [33].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shao H., Wu X., Xiao Y., Yang Y., Ma J., Zhou Y., Chen W., Qin S., Yang J., Wang R., Li H. Recent research advances on polysaccharide-, peptide-, and protein-based hemostatic materials: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2024;261(Pt. 1):129752.
2. Wang L., Hao F., Tian S., Dong H., Nie J., Ma G. Targeting polysaccharides such as chitosan, cellulose, alginate and starch for designing hemostatic dressings. *Carbohydr. Polym.* 2022;291:119574.
3. Gholap A., Rojekar S., Kapare H., Vishwakarma N., Raikwar S., Garkal A., Mehta T., Jadhav H., Prajapati M., Annapure U. Chitosan scaffolds: Expanding horizons in biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 2024;323:121394.
4. Kumar A., Vimal A., Kumar A. Why chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;91:615–622.
5. Wang W., Meng Q., Li Q., Liu J., Zhou M., Jin Z., Zhao K. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(2):487.
6. Naveed M., Phil L., Sohail M., Hasnat M., Baig M., Ihsan A., Shumzaid M., Kakar M., Khan T., Akabar M., Hussain M., Zhou Qi-Gang. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;129:827–843.
7. Wang C.-H., Cherg J.-H., Liu C.-C., Fang T.-J., Hong Z.-J., Chang S.-J., Fan G.-Y., Hsu S.-D. Procoagulant and antimicrobial effects of chitosan in wound healing. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(13):7067.
8. Zhao J., Qiu P., Wang Y., Wang Y., Zhou J., Zhang B., Zhang L., Gou D. Chitosan-based hydrogel wound dressing: From mechanism to applications, a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2023;244:125250.
9. Madurantakam P., Bowlin G., Moskowitz K.A. Woundstat™ topical hemostat reverses clotting diatheses in models of acquired and congenital hemophilia. *Blood.* 2008;112(11):2267.
10. Quade-Lyssy P., Ungerer C., Milanov P., Seifried E., Schüttrumpf J. Oral gene delivery of factor IX mutants formulated as chitosan nanoparticles for the treatment of hemophilia B. *Blood.* 2012;120(21):2048.
11. Misgav M., Lubetszki A., Brutman-Bazarini T., Martinowitz U., Kenet G. The hemostatic efficacy of chitosan-pads in hemodialysis patients with significant bleeding tendency. *J. Vasc. Access.* 2017; 18 (3):220–224.
12. Li X., Ji X., Chen K., Ullah M.W., Li B., Cao J., Xiao L., Xiao J., Yang G. Immobilized thrombin on X-ray radiopaque polyvinyl alcohol/chitosan embolic microspheres for precise localization and topical blood coagulation. *Bioact. Mater.* 2021; 6 (7):2105–2119.

Заключение

Таким образом, из полученных в настоящей работе результатов следует, что кровоостанавливающий препарат хитозана способен блокировать процессы деполимеризации фибрина, повышая уровень фибриногена и степень полимеризации фибрина. Отмечено, что влияние хитозана на первичный гемостаз, выражающийся в повышении агрегации тромбоцитов, приводит к блокаде явлений кровоточивости, вызываемой антиагрегантом клопидогрелем. При этом данный процесс довольно быстрый и начинается с первых минут. Следовательно, хитозан можно отнести к защитным агентам, повышающим или нормализующим свертывающий потенциал крови и устраняющим кровоточивость при геморрагических состояниях различного генеза.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова по фундаментальной теме № 121032300071-8 «Регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем организма в норме и при патологии». Все экспериментальные процедуры проведены в соответствии с международными биоэтическими нормами (Директива 2010/63/EU Европейского сообщества от 22.09.2010 г.) и с соблюдением этических норм работы с животными, установленными национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и биоэтическим комитетом учреждения (протокол № 2 от 04.06.2019 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

13. Камская В.Е. Хитозан: структура, свойства и использование. *Научн. обзор. Биол. науки*. 2016;6:36–42.
14. Wang W., Xue C., Mao X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020;164:4532–4546.
15. Huang Y., Zhang Y., Feng L., He L., Guo R., Xue W. Synthesis of N-alkylated chitosan and its interactions with blood. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018;46(3):544–550.
16. Zhang W., Zhong D., Liu Q., Zhang Y. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013;24(13):1549–1563.
17. Толстенков С.А., Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Банникова Г.Е. Биоспецифичный электрофорез комплексов между низкомолекулярными гепаринами и хитозанами. *Матер. Восьмой Межд. конф. М.: Изд-во ВНИРО*; 2006:253–256.
18. Guo X., Sun T., Zhong R., Ma L., You C., Tian M., Li H., Wang C. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components. *Front. Pharmacol.* 2018;9:1412.
19. Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е. Влияние полисахарида хитозана на плазменный гемостаз: исследование *in vitro*. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2022; (4):30–34.
20. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Исследование гемостатических свойств препарата на основе хитозана. *Биофарм. журнал*. 2022;14(1):3–7.
21. Benesch J., Tengvall P. Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*. 2002;23(12):2561–2568.
22. Denzinger M., Hinkel H., Kurz J., Hierlemann T., Schlensak Ch., Wendel H.P., Krajewski S. Hemostatic property of chitosan: Opportunities and pitfalls. *Biomed. Mater. Eng.* 2016;27(4):353–364.
23. Izaguirre-Avila R., De la Peña-Díaz A., Barinagarrementeria-Aldatz F., González-Pacheco H., Ramírez-Gutiérrez A.E., Ruiz-Sandoval J.L., Quiroz-Martínez A., Cantú-Brito C. Effect of clopidogrel on platelet aggregation and plasma concentration of fibrinogen in subjects with cerebral or coronary atherosclerotic disease. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2002;8(2):169–177.
24. Kuszynski D., Lauver D. Pleiotropic effects of clopidogrel. *Purinergic Signal.* 2022; 18(3):253–265.
25. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. *Основы физиологии и биохимии свертывания крови*. М.: Изд-во Моск. ун-та; 2023. 159 с.
26. Okamoto Y., Yano R., Miyatake K., Tomohiro I., Shigemasa Y., Minami S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydr. Polym.* 2003;53(3):337–342.
27. Klokkevold P.R., Fukayama H., Sung E.C., Bertolami C.N. The effect of chitosan (poly-N-acetyl glucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1999; 57(1): 49–52.
28. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-изд-во; 2010. 832 с.
29. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. *Регуляторные пептиды как противотромботические агенты*. М.: Ким Л.А.; 2021. 108 с.
30. Lyapina L., Grigorjeva M., Lyapin G., Obergan T., Shubina T. Aggregation effects of chitosan in the blood. *NJD-iScience*. 2021;(61):13–16.
31. Бокарев И.Н. *Гематология для практического врача*. М.: Медицинское информ. агентство; 2018. 344 с.
32. Rodriguez-Merchan E.C. Local fibrin glue and chitosan-based dressings in haemophilia surgery. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2012;23(6):473–476.
33. Olabisi O.S., Nathan A.F. Topical coagulant agents. *Surg. Clin. North. Am.* 2022;102(1):65–83.

Поступила в редакцию 22.12.2023

После доработки 04.07.2025

Принята в печать 30.05.2025

RESEARCH ARTICLE

The corrective effect of chitosan on hemostasis parameters under hypocoagulation conditions caused by the antiplatelet agent clopidogrel

L.A. Lyapina , M.E. Grigorjeva , T.Y. Obergan* , T.A. Shubina 

Laboratory of Blood Protection Systems, Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: tobergan@mail.ru

The effect of chitosan *in vitro* on the blood plasma of healthy rats and rats with acquired bleeding caused by the use of the antiplatelet agent clopidogrel, which irreversibly inhibits P2Y₁₂ platelet receptors, was studied. It has been shown that the degree of procoagulant activity of chitosan does not depend on the incubation time (5 and 30 minutes at 37°C) when it is added to the blood plasma pool from healthy animals. However, there was a significant decrease (by 27%) in the fibrin-depolymerization activity of blood plasma, which is even more suppressed (by 42%) with an increase in incubation time. When chitosan was added to hypocoagulation plasma obtained after oral administration of the antiplatelet agent clopidogrel to rats (once, orally at a dose of 5 mg/kg) and incubation for 5 minutes, a pronounced activation of blood clotting was established. This was evidenced by increased values of fibrinogen concentration (by 38%), fibrin polymerization (by 51%) and platelet aggregation (by 32%), while significantly reducing fibrin

depolymerization activity of the blood (by 47%). With an extension of the incubation time of hypocoagulation plasma with chitosan, more pronounced effects of this drug were observed, which manifested itself in a significant increase in the concentration of fibrinogen, platelet aggregation, the degree of polymerization of fibrin and a decrease in thrombin time, characterizing the general pathway of blood coagulation. So, the hemostatic drug chitosan leads to a blockade of bleeding phenomena caused by clopidogrel used in the clinic, which was studied for the first time in this work.

Keywords: *platelet aggregation, hypocoagulation, clopidogrel, fibrin polymerization, hemostasis system, fibrin stabilizing factor, chitosan*

Funding: This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number 121032300071-8.

Сведения об авторах

Ляпина Людмила Анисимовна – проф., докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: lyapinal@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Григорьева Марина Евгеньевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: mgrigorjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0469-3943>

Оберган Тамара Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: tobergan@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Шубина Татьяна Александровна – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11; e-mail: shubina.74@mail; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0445-2066>

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](#)