



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ и МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 6, 2024

Адаптация эритроцитов: роль гемоглобина, оксида азота
и метилглиоксаля (Обзор)

О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов 563

Механизмы антимикробного действия жирных кислот (Обзор)

Е. С. Обухова, С. А. Мурзина 580

Влияние ДНК-связывающих белков на ферментативную активность терминальной
дезоксинуклеотидилтрансферазы в системах с гомополимерными субстратами

А. Б. Саченко, В. В. Щур, С. А. Усанов, А. В. Янцевич 589

Филогенетический состав микробных сообществ обрастаний титановых
пластин в прибрежной зоне Черного и Белого морей

*А. Л. Брюханов, А. С. Шутова, К. А. Комарова, Т. А. Семенова,
А. А. Семенов, В. А. Карпов* 602

Участие активных форм кислорода и оксида азота в защите пшеницы
с геном *Sr25* от стеблевой ржавчины

В. В. Кнауб, Л. Я. Плотникова 610

Влияние эндофитных бактерий *Bacillus subtilis* 26Д и *Bacillus velezensis* M66
на устойчивость растений картофеля к возбудителю альтернариоза *Alternaria solani*

А. В. Сорокань, В. Ф. Габдрахманова, И. С. Марданишин, И. В. Максимов 623

Влияние конъюгата хитозана с кофейной кислотой и *Bacillus subtilis* на защитные
реакции растений картофеля при вирусном заражении и почвенной засухе

*Ж. Н. Калацкая, Л. Г. Яруллина, Н. А. Еловская, Г. Ф. Бурханова, Е. И. Рыбинская,
Е. А. Заикина, И. А. Овчинников, В. О. Цветков, К. М. Герасимович,
Е. А. Черепанова, О. А. Иванов, К. С. Гилевская, В. В. Николайчук* 632

Новые гликозиды акацетина и другие фенольные соединения
из *Agastache foeniculum* и их влияние на моноаминоксидазы А и В

Д. Н. Оленников, Н. И. Кащенко 645

CONTENTS

Vol. 60, No. 6, 2024

Adaptation of Erythrocytes: The Role of Hemoglobin, Nitric Oxide
and Methylglyoxal (Review)

O. V. Kosmachevskaya and A. F. Topunov 563

Mechanisms of the Antimicrobial Action of Fatty Acids (Review)

E. S. Obukhova and S. A. Murzina 580

Effect of DNA-Binding Proteins on Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity
in Systems with Homopolymer Substrates

A. B. Sachanko, V. V. Shchur, S. A. Usanov, and A. V. Yantsevich 589

Phylogenetic Composition of Microbial Communities from Fouling
of Titanium Plates in the Coastal Zone of the Black and White Seas

*A. L. Bryukhanov, A. S. Shutova, K. A. Komarova, T. A. Semenova,
A. A. Semenov, and V. A. Karpov* 602

Participation of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide
in Defense of Wheat with the *Sr25* Gene from Stem Rust

V. V. Knaub and L. Ya. Plotnikova 610

Influence of Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis* 26D and *Bacillus velezensis* M66
on the Resistance of Potato Plants to the Early Blight Pathogen *Alternaria solani*

A. V. Sorokan, V. F. Gabdrakhmanova, I. S. Mardanshin, and I. V. Maksimov 623

Effect of Chitosan-Caffeic Acid Conjugate and *Bacillus subtilis* Bacteria
on the Protective Reactions in PVY-Infected Plants Under Soil Water Deficit

*J. N. Kalatskaja, L. G. Yarullina, N. A. Yalouskaya, G. F. Burkhanova,
E. I. Rybinskaya, E. A. Zaikina, I. A. Ovchinnikov, V. O. Tsvetkov, K. M. Herasimovich,
E. A. Cherepanova, O. A. Ivanov, K. S. Hileuskaya, and V. V. Nikalaichuk* 632

New Acacetin Glycosides and Other Phenolics from *Agastache foeniculum*
and Their Influence on Monoamine Oxidase A and B

D. N. Olennikova and N. I. Kashchenko 645

УДК 612.017.2:612.111

АДАПТАЦИЯ ЭРИТРОЦИТОВ: РОЛЬ ГЕМОГЛОБИНА, ОКСИДА АЗОТА И МЕТИЛГЛИОКСАЛЯ

© 2024 г. О. В. Космачевская¹, А. Ф. Топунов^{1, *}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: aftpunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Все живые системы характеризуются такими фундаментальными свойствами, как способность к адаптации и саморегуляции. Безъядерные эритроциты млекопитающих также обладают способностью к адаптации к внешним воздействиям, но их регуляторные возможности ограничиваются цитоплазматическими механизмами, включающими фазовые переходы белков и мембран. Это один из древнейших механизмов приспособления живых систем к условиям внешней и внутренней среды. Эритроциты при изменении состава цитоплазмы, старении и энергетическом истощении претерпевают обратимую морфофункциональную трансформацию, переход из дискоцита в эхиноцит. Происходящие при этом сдвиги метаболизма соответствуют комплексу универсальных изменений, возникающих при переходе эритроцита в состояние метаболического угнетения. Как правило, эхиноцитоз рассматривают как патологический процесс, предшествующий эриптозу и гемолизу. Однако его можно рассматривать и как первый этап реализации универсальной программы пассивной адаптации клетки, конечной целью которой является переход в состояние анабиоза. Энергетический статус эритроцита определяется равновесием между растворимой и мембраносвязанной формами гемоглобина (Hb). Вещества с выраженными электрофильными свойствами — оксид азота и метилглиоксаль, влияющие на это равновесие, могут индуцировать переход эритроцита из одного метаболического состояния в другое. Механизм их действия во многом связан с модификацией тиоловых групп белков мембраны и цитоскелета, а также реакционноактивных SH-групп Hb. Представляется актуальным рассмотрение влияния этих метаболитов на состояние гемоглобина и эритроцитов.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, мембраны, тиолы, адаптация, редокс-регуляция, оксид азота, метилглиоксаль

DOI: 10.31857/S0555109924060012 EDN: QGZJPO

Приспособление к изменениям условий среды — фундаментальное свойство всех живых организмов. Несмотря на отсутствие ядерного и белоксинтезирующего аппаратов в эритроцитах млекопитающих, эти клетки обладают многоуровневой способностью к адаптации. Приведем несколько ссылок из большого количества статей на данную тему [1–8]. В отличие от ядросодержащих клеток, адаптационные возможности эритроцитов млекопитающих ограничены цитоплазматическими механизмами, основу которых составляют обратимые кооперативные фазовые переходы белков, взаимодействие их с мембраной, изменения в мембранных белках и белках цитоскелета, а также нарушение проницаемости мембраны [9]. Развертка адаптационного ответа в любой клетке начинается с неспецифического комплекса реакций, описанного в литературе, и только позже подключаются механизмы специфической регуляции. Неспецифический ответ

реализуется на уровне изменений протеома, известный как “универсальная клеточная реакция”, которая есть не что иное, как проявление филогенетически древней программы реагирования клетки на различные факторы [10–12].

Интересен и вопрос о роли микроРНК в эритроцитах, поскольку они являются основным источником микроРНК в крови. Эритроцитарная микроРНК может иметь как внутриклеточное, так и внеклеточное происхождение. Особо следует отметить микроРНК, сохранившуюся в эритроцитах со времени эритроидной дифференцировки. Исследования влияния микроРНК на метаболизм эритроцитов при гипоксии не проводились, однако обсуждается их возможная роль в адаптации эритроцитов к гипоксии по аналогии с другими клетками и тканями [13].

Из-за отсутствия ядерного аппарата и простоты устройства, эритроциты являются удобной моделью для изучения цитоплазматических (негенетических) механизмов формирования адаптационного ответа, ключевую роль в реализации которого играет молекула гемоглобина (Hb) и факторы, влияющие на ее структурно-функциональное состояние. В настоящем обзоре описана функциональная роль Hb в развитии цитоплазматических механизмов формирования метаболического состояния эритроцитов и влияние на этот процесс метаболитов оксида азота и метилглиоксала. Именно из-за относительной простоты устройства к эритроцитам может быть особенно хорошо применена фраза Нобелевского лауреата Сент-Джёрджи: “В основе живой природы лежит относительно небольшое число фундаментальных принципов, мудро приспособленных для самых разнообразных целей” [14].

Понимание феномена неспецифической адаптации на примере эритроцита позволит полнее раскрыть законы и механизмы приспособительной деятельности, развивающейся на уровне цитоплазмы.

ФЕНОМЕН АДАПТАЦИИ ЭРИТРОЦИТА

Связь адаптации со старением. Условия, в которых функционируют эритроциты, накладывают определенные требования к развитию их адаптивных возможностей. Эритроциты периодически подвергаются смене кислородного режима, механическому и осмотическому воздействию. К эпизодическим факторам можно отметить действие эндогенных и экзогенных токсинов, активных форм кислорода и азота. Перечисленные факторы вызывают повреждение и износ клеточных компонентов.

Известно, что эритроциты могут претерпевать обратимые изменения морфологических и биохимических параметров: увеличение вязкости, снижение деформируемости, выход ионов калия и вход ионов кальция, изменение формы. Аналогичные изменения показаны для истощенных по АТФ и “старых” эритроцитов. В зависимости от глубины нарушений, такие измененные эритроциты могут со временем либо вернуться к физиологически нормальным параметрам, либо погибнуть по механизму апоптоза (эриптоза) [15] или лизировать. Можно выделить три пути гибели эритроцитов:

- 1) гемолиз, сопровождающийся набуханием эритроцитов и разрывом плазматической мембраны вследствие выхода K^+ и входа Cl^- ;
- 2) эриптоз;
- 3) старение, сопровождающиеся сморщиванием эритроцитов и везикулообразованием вследствие выхода K^+ и Cl^- и H_2O .

Таким образом, эриптоз можно характеризовать как механизм предотвращения гемолиза и ускорения старения.

Изменения эритроцитов на обратимых стадиях изменений, как мы полагаем, носят адаптивный характер и направлены на увеличение стабильности в изменившихся условиях. Здесь мы исходим из известного положения, что в основе старения и адаптации лежат общие механизмы.

Эхиноцитарная трансформация. Жизнь клетки описывается как череда состояний активации (возбуждения) и покоя (торможения). Эритроциты не являются исключением. Рабочий цикл эритроцита складывается из оксигенации в капиллярах легких и дезоксигенации в капиллярах тканей. Процессы оксигенации/дезоксигенации сопровождаются конформационными переходами гемоглобина (R–T-переход). Молекула Hb существует в двух энергетических состояниях: напряженном “T” и расслабленном “R”. Эти два состояния отличаются энергией взаимодействия между субъединицами [16–19]. R-конформеры Hb характеризуются более рыхлой структурой, доступными реакционноактивными SH-группами и связанными ионами калия [16–19]. Дезоксигенация приводит к уплотнению молекулы Hb, снижению доступности SH-групп, высвобождению ионов калия и увеличению сродства к цитоплазматическому домену трансмембранного белка полосы 3 [20]. Таким образом, в самом цикле функционирования эритроцита происходят обратимые кооперативные переходы Hb, вызывающие изменения его конформационного и фазового состояния.

Под действием различных факторов, энергетическом истощении, изменении состава плазмы, а также в результате старения или длительного хранения эритроциты изменяют форму: двояковогнутый диск (дискоцит) может трансформироваться в шарообразную (сфероцит) или шпоровидную форму (эхиноцит) [21–23].

Эхиноцитарная трансформация происходит через ряд стадий, на каждой из которых образуется определенный вид эхиноцитов [24, 25]. Всего выделяют четыре вида эхиноцитов, между ними возможны последовательные обратимые переходы вплоть до нормальной формы (дискоцита), и только заключительная стадия эхиноцитарной трансформации является необратимой [26]. Необратимо измененная клетка погибает, как правило, апоптотическим путем. По этой причине эхиноциты относят к патологическим формам эритроцитов, появление которых предшествует эриптозу или гемолизу.

В контексте обсуждаемой темы наибольший интерес представляет состояние “торможения”, которое можно рассматривать как состояние покоя с более низким уровнем чувствительности (возбудимости). Переход в это физиологическое состояние сопровождается морфологическими и

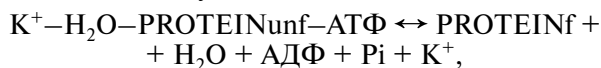
биохимическими сдвигами, которые совпадают с описанными в литературе признаками старения эритроцитов — эхиноцитарной трансформацией (сморщивание клетки). Это потеря ионов калия, низкоэнергетический сдвиг, гиперполяризация мембраны, снижение сорбционной способности цитоплазмы, повышение резистентности [26, 27].

Эхиноциты в несколько раз более устойчивы к различным воздействиям, но менее деформируемы. Способность к деформации — необходимое для функционирования эритроцитов свойство, благодаря которому они проникают в узкие капилляры тканей. Получается, что клетка как бы жертвует своей функциональностью ради сохранения структурной целостности. Можно высказать предположение, что эхиноцитарная трансформация — это реализация филогенетически древней программы пассивной адаптации клетки. При такой адаптации эритроциты могут утратить функциональную активность, но сохранить жизнеспособность. Элементарной реакцией такого адаптационного процесса является превращение комплекса ион—вода—белок, который в свою очередь устанавливает характер белок-белковых и белок-липидных взаимодействий. Главная роль в этих взаимодействиях принадлежит гемоглобину — основному белку эритроцитов, концентрация которого ~5 мМ при ~40%-ном гематокрите.

УНИВЕРСАЛЬНАЯ БЕЛКОВАЯ РЕАКЦИЯ

Ион—вода—белковый комплекс. Основоположниками учения об универсальных реакциях белков являются Д.Н. Насонов и В.Я. Александров [10, 11]. Благодаря работам этих ученых был сделан вывод, что начальные стадии денатурации белков характеризуются общими чертами: уменьшением гидратированности, активацией аминных, карбоксильных и сульфгидрильных групп, экспонированием неполярных участков, увеличением объема. Также к проявлениям общих неспецифических изменений, происходящих при повреждении белков, можно причислить образование дополнительных центров связывания металлов [28].

Опираясь на денатурационную теорию повреждения и возбуждения Д.Н. Насонова и теорию ассоциации—индукции Линга, В.В. Матвеев [12] рассматривает адаптационный процесс клетки как процесс молекулярных перестроек белков внутри клетки, который в общем виде можно представить как переход молекулы белка из состояния расплавленной глобулы с доступными для воды и ионов калия полипептидными участками в состояние компактной глобулы:



где PROTEINunf — развернутая молекула белка, PROTEINf — компактная молекула белка.

Состояние расплавленной глобулы относится к клетке в состоянии покоя, а компактной глобулы — к клетке в активированном состоянии. Между двумя этими состояниями существует динамическое равновесие: чем сильнее молекула белка смещена в сторону развернутого состояния, тем выше устойчивость клетки. Согласно этой концепции, изменения в структуре комплекса ион—вода—белок, возникающие сразу после оказанного на клетку воздействия, составляют физическую основу реагирования живой системы. Переход белков из одной конформации в другую влечет за собой изменение коллоидных свойств протоплазмы: вязкости, текучести, растяжимости и др.

Вероятно, становление универсальной белковой реакции происходило еще на заре возникновения жизни в доклеточных структурах — протобионтах и было одним из первых механизмов формирования биологического сигнала. Исходя из этих рассуждений, R—T—переход Hb можно рассматривать как аналог прореакции.

Переход гемоглобина в состояние расплавленной глобулы. Имеются доказательства существования одной или нескольких промежуточных стадий при переходе белка из нативного состояния в развернутое. Для многих глобулярных белков обнаружено частично развернутое промежуточное состояние — расплавленная глобула [29, 30]. Белки в этом состоянии характеризуются выраженной вторичной и флуктуирующей третичной структурой, а также увеличенной гидрофобной поверхностью. Переход в состояние расплавленной глобулы происходит под действием низких и высоких значений pH, умеренных концентраций денатурирующих агентов и некоторых солей, а также при нагревании. Показано, что Hb переходит в это состояние под действием активного карбонильного соединения глиоксаля [31] и органического растворителя 2,2,2-трифтораэтанола [32, 33]. Через состояние расплавленной глобулы происходит фолдинг и сборка Hb [34]. Такой сценарий постулируется не только для систем *in vitro*, но и для клеточных систем.

В эритроците в результате различных патологических процессов образуются повышенные количества редокс-активных веществ, которые действуют на Hb и индуцируют его переход в обратимый гемихром — состояние, сходное с расплавленной глобулой [34–37]. При этом происходит активация и демаскировка сульфгидрильных групп, которые становятся доступными для связывания ионов металлов [28]. Присоединение металлов может повлиять на физико-химические свойства белка, его реакционную способность и устойчивость к денатурации и протеолитической деградации.

В работе [34] был охарактеризован процесс денатурации Hb, который включает самоокисление до метHb с последующей диссоциацией гемина (Fe-протопорфирина IX) и разворачиванием

апогемоглобина. Образование гемихромов предотвращает отделение гемина от молекул белка с измененной конформацией. Это объясняет причину перехода Нб с неправильной укладкой в гемихромы, которые накапливаются в виде нерастворимых включений (тельца Гейнца) в эритроцитах пациентов с гемоглобинопатиями.

Обратимые гемихромы также образуются при воздействии на Нб жирных кислот [38], алифатических спиртов, дегидратации, высоких концентраций глицерина, полиэтиленгликоля, продуктов реакции Майяра [39], а также в реакции окислительного денитрозилирования [40]. Обсуждается возникновение гемихромов в эритроцитах по механизму анион-индуцируемого автоокисления охуНб [41, 42]. Обсуждается возможность образования фибрилл с тетрамерными гемоглобинами в состоянии гемихрома [43].

ДВУХФАЗНАЯ РЕАКЦИЯ НА ПРИМЕРЕ ЭРИТРОЦИТА

Был поставлен простой эксперимент: эритроциты, полученные из свежей донорской крови, подвергали воздействию хлорноватистой кислоты (HOCl/OCl^-) в возрастающих концентрациях [44]. HOCl вызывает повреждение липидов мембран и белков цитоскелета, провоцируя разрушение эритроцитов и выход Нб в раствор. По количеству Нб в растворе можно было судить о степени повреждения клеточных структур. Можно было предположить линейную зависимость количества Нб в растворе от концентрации HOCl . Однако эта зависимость имела U-образный вид (рис. 1). Это означает, что в зоне средних концентраций окислителя эритроциты были более устойчивы, чем при малых и высоких дозах. Такой характер кривой вполне объясним. U-образная кривая является графическим выражением двухфазного ответа клетки, в основу которого положены общие для живых организмов принципы взаимодействия с окружающей средой, направленные на формирование адаптивной структурно-функциональной перестройки. Любая форма клеточной активности может усиливаться или подавляться в зависимости от силы/времени приложенного стимула или дозы химического вещества.

Фазный характер ответных реакций клетки известен в цитологии как закон Арндта-Шульца: “Каждый раздражитель, действуя на одиночную клетку или группу клеток, составляющих орган, вызывает усиление или ослабление их физиологической деятельности в зависимости от меньшей или большей интенсивности раздражителя...” [цитировано по 11]. Этот ответ также называют “неспецифическая реакция клетки” [10], “неспецифический адаптационный синдром клеточной

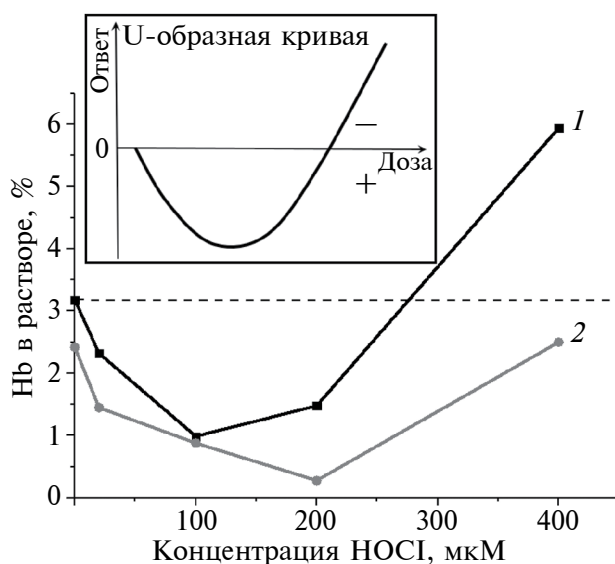


Рис. 1. Индуцированный хлорноватистой кислотой (HOCl/OCl^-) гемолиз эритроцитов: 1 – контрольный образец, 2 – эритроциты, предобработанные ДНКЖ-GS. Каждая точка – среднее из трех опытов. Горизонтальная пунктирная прямая – уровень автогемолиза в контроле. На врезке: схематичное изображение U-образной гормезисной кривой “доза–ответ”.

системы” [45], “универсальная клеточная реакция” или “протореакция” [12].

Симптомы неспецифического адаптационного синдрома наблюдаются у любых клеток при действии неблагоприятных факторов. Во второй фазе реагирования происходит увеличение светорассеяния цитоплазмы и ядра, повышение вязкости и коагуляция цитоплазмы, а также ее закисление. Для этой фазы также характерны нарушения сопряженности дыхания и фосфорилирования, усиление аэробного гликолиза, увеличение содержания свободных радикалов, снижение мембранного потенциала и синтез стрессовых белков. Переход клетки из фазы I в фазу II сопровождается либо поглощением воды (набуханием), либо дегидратацией (сморщиванием). При этом дегидратация сопряжена с увеличением устойчивости клетки (табл. 1).

Явление стимулирующего воздействия дозами, недостаточными для проявления вредных последствий, обозначается термином *гормезис*. В то же время Д.Н. Насонов активно развивал идею двухфазности реакции [10], а термин *гормезис* не использовал. В настоящее время концепцию гормезиса активно развивает Калабрезе [46, 47]. Тот факт, что эритроциты обнаруживают эффект гормезиса, свидетельствует о том, что процессы, обуславливающие двухфазную реакцию, могут быть независимы от генетической информации и связаны с превращениями цитоплазмы.

Таблица 1. Механизмы, обеспечивающие увеличение устойчивости клетки, при дегидратации

Дегидратация (сморщивание клетки)	Последствия дегидратации для клетки
Уменьшение объема клетки	Увеличение соотношения поверхность/объем способствует увеличению скорости теплообмена, в результате чего возрастает скорость снижения энергии системы, а также уменьшается площадь контакта со средой
Исключение из клетки лабильно-связанной (химически активной) воды	Снижение растворяющей способности протоплазмы, что приводит к замедлению, диффузии и ограничению скоростей ферментативных реакций, в результате чего замедляются метаболические превращения
Появление пространственной сетчатой структуры белков	Ограничение диффузии низкомолекулярных веществ, субстратов и продуктов, вследствие чего замедляется метаболизм
Изменение соотношение гидрофобных и гидрофильных групп	Может привести к инаktivации ферментов вследствие изменения их конформации
Связывание молекул белка в виде сетчатой структуры	Ограничение конформационных колебаний белковой молекулы, необходимых для совершения рабочего акта
Десорбция ионов калия	Снижение активности ферментов, активируемых ионами калия
Вход в клетку ионов натрия	Может способствовать увеличению жесткости мембраны, поскольку натриевые соли жирных кислот менее растворимы, чем калиевые

Еще в первой половине XX века был описан феномен набухания—сокращения клеток и органелл, вызываемый разнообразными воздействиями [48]. Известно, что объем эритроцитов по мере совершения рабочего цикла изменяется: в венозной крови он больше, чем в артериальной. Флуктуации объема можно рассматривать как один из показателей физиологического состояния эритроцитов. Осцилляциями объема эритроцит отвечает не только на изменение парциального давления кислорода, но и на другие факторы внеклеточные (рН, осмотическое давление, ионный состав) и внутриклеточные (старение, энергетическое истощение, окислительный стресс) [22, 23]. Изменение формы эритроцита часто можно наблюдать и при нарушениях гемостаза, тромбозах [49] и наследственных энзимопатиях [50].

Роль гемоглобина в формировании адаптации эритроцита. Известно, что функция Hb в эритроцитах не ограничивается транспортом газов. Этот белок участвует в настройке свойств эритроцита в зависимости от кислородных и редокс-условий. Гемоглобин регулирует энергетический метаболизм, ионный транспорт, деформируемость клетки, экспорт NO и АТР, а также участвует в модуляции уровня глутатиона в эритроцитах [8, 44, 51].

Эти функции Hb осуществляет благодаря способности взаимодействовать с клеточной мембраной. Гемоглобин также является молекулярным триггером часов эритроцита [52–54]. В табл. 2

представлены некоторые процессы с участием Hb и их значение для адаптации эритроцита.

Переход Hb в мембраносвязанное состояние. Гемоглобин в нативной и измененной конформации может связываться с белками мембраны и цитоскелета эритроцита [55, 56]. Переход Hb из растворимого в мембраносвязанное состояние (**MBHb** — Membrane-Bound Hemoglobin) — это один из механизмов регуляции метаболизма и настройки морфо-функциональных свойств в эритроцитах млекопитающих [51]. Взаимодействовать с мембранами Hb может в разных лигандных и окислительно-восстановительных состояниях, что позволяет ему функционировать в качестве датчика редокс-и кислородных условий [51, 56, 57].

Взаимодействовать с мембранами Hb может разными способами: электростатическое связывание deoxyHb по цитоплазматическому домену анион-транспортного белка полосы 3 (**CDB3** — Cytoplasmic Domain of Band 3 protein) [58], адсорбция к мембранным липидам с помощью гидрофобных взаимодействий [59]. Hb в составе телец Гейнца может быть ковалентно пришит к компонентам мембраны дисульфидными связями [60]. Также Hb может связываться с белками цитоскелета: спектрином и гликофорином [55, 61]. Связывание Hb с мембраной может быть обратимым и необратимым. Обратимо с высоким сродством Hb связывается с CDB3 [62]. Необратимым является ковалентное связывание Hb с компонентами

Таблица 2. Участие гемоглобина в адаптации эритроцитов

Процессы с участием гемоглобина	Значение для адаптации
Модификации, стабилизирующие R-конформацию и повышающие сродство к O ₂	Снижение вероятности образования O ₂ ⁻ в результате автоокисления
Переход Hb в форму обратимого гемихрома	Снижает реакционные свойства гемового железа, а также предотвращает высвобождение гема
Блокирование доступных SH-групп Hb. Образование аддуктов с электрофилами (аддуктов Михаэля)	Повышение окислительной стабильности белка, предотвращение потери гема
Образование нитрозильных комплексов железа, связанных с Hb	Защита βCys93 от окисления. Изменение реактивности белка: блокирование или сенсibilизация
Высвобождение нековалентно связанного GSH из Hb	Антиоксидантная защита при гипоксии
Образование лабильных агрегатов Hb	Повышение общей стабильности белка за счет снижения доступа растворителя к реакционноактивным группам
Ассоциация Hb с клеточной мембраной	Регуляция энергетического обмена, морфологии, деформируемости, ионного транспорта, продолжительности жизни эритроцита. В некоторых случаях может быть стабилизация мембраны
Пероксидазная активность metHb	Усиление антиоксидантной защиты
Увеличение гетерогенности Hb	Предотвращение кристаллизации гемоглобина

мембраны вследствие действия различных окислительных агентов (H₂O₂, *t*-BOOH, HOCl, NO₂, NO₂⁻) [63–66].

Через взаимодействие с CDB3 деохиHb в зависимости от кислородных условий изменяет энергетический обмен, морфологию, деформируемость, высвобождение регуляторов сосудистого тонуса — NO и АТФ [8, 51, 67, 68].

Сигнальную функцию выполняют также и продукты окисления и денатурации Hb: обратимые и необратимые гемихромы [51]. Накапливаясь со временем или в результате окислительного стресса, гемихромы несут информацию о редокс-условиях и продолжительности жизни эритроцита. Отложение гемихромов сопровождается повышением проницаемости мембраны для ионов калия, перекисным окислением липидов, сшиванием мембранных белков, снижением деформируемости клетки [69]. Ковалентное связывание гемихромов с мембранами приводит к кластеризации Band3 и удалению эритроцитов из кровотока [56].

Авторы работы [56] предложили концепцию, согласно которой умеренный окислительный стресс инициирует связывание Hb с мембраной. Они показали, что чем выше степень окисления гемоглобина (от Fe^{III} до Fe^V), тем в большей степени он связывается с мембраной, при этом примерно половина молекул Hb связывается за счет реакционноактивных сульфгидрильных групп. По некоторым данным, обратимое связывание Hb с

мембраной может быть адаптивной реакцией, направленной на стабилизацию липидного бислоя мембран [70, 71] и/или регуляцию его упруго-механических свойств [72].

Белок полосы 3 является центром организации мембраны, цитоскелета и регулятором ионного гомеостаза, поэтому даже незначительные изменения в связывании Hb с Band3 приводят к изменению морфофункциональных свойств эритроцитов. Известно, что посттрансляционная модификация Band3 фосфорилированием тирозинов нарушает его способность связывать Hb и белки цитоскелета [73]. Можно предположить, что и другие модификации в связывающем участке Band3, например, нитрование тирозинов и S-нитрозилирование цистеинов, приводят к нарушению кислородзависимой регуляции свойств эритроцита. Следует отметить, что благодаря реакционноактивным цистеинам CDB3 функционирует как датчик редокс-состояния клетки [74].

Увеличение доли MBHb влияет на механические свойства клетки и, в частности, на ее деформируемость. Была обнаружена отрицательная корреляция между деформируемостью эритроцита и количеством MBHb [8]. Благодаря изменению деформируемости эритроциты адаптируются к реологическим параметрам сосудистого русла. Особенно это выражено в микрососудах, в которых велико напряжение сдвига, вызванного потоком.

Это позволяет оптимизировать доставку кислорода и минимизировать сопротивление клеток потоку.

Гемоглобин как регулятор энергетического состояния эритроцитов. Регуляция многих процессов в живых системах обеспечивается совместной деятельностью разнонаправленных процессов. Так, физиологическое состояние эритроцита определяется энергетическим обменом, который представлен двумя альтернативными метаболическими путями — гликолитическим и пентозофосфатным. От распределения потока глюкозы между этими двумя путями зависят многие параметры клетки: реактивность, лабильность, резистентность, деформируемость. Гемоглобин является компонентом внутриклеточного механизма регуляции энергетического обмена. Обратимое пространственное перераспределение Hb позволяет быстро менять уровень клеточного метаболизма, что особенно важно для эритроцитов, у которых из-за отсутствия генетического аппарата невозможна регуляция через индукцию экспрессии генов. В этом случае переход Hb в мембраносвязанное состояние является механизмом формирования быстрого адаптивного ответа на изменяющиеся условия [51].

Увеличение доли deoxyHb в условиях гипоксии приводит к вытеснению ферментов гликолиза с сайта связывания с CDB3 и переходу их в растворимое активное состояние [68, 75]. Таким образом, Hb переключает метаболизм с пентозофосфатного пути на гликолитический в ответ на изменение кислородных условий в клетке [76]. С одной стороны, это способствует увеличению внутриклеточного АТФ, а, с другой, уменьшает поток глюкозы, поступающей в пентозофосфатный путь, в котором образуется NAD(P)H, являющийся кофактором антиоксидантных ферментов.

Выделяют две альтернативные стратегии биохимической адаптации: активную, сопровождающуюся увеличением синтеза АТФ и активацией энергозависимых процессов, и пассивную, сопровождающуюся уменьшением напряженности метаболических систем и усилением антиоксидантной защиты. В эритроците выбор стратегии биохимической адаптации сводится к проблеме перераспределения ресурсов между альтернативными метаболическими путями — гликолизом и пентозофосфатным путем. Гликолиз поставляет клетке АТФ, необходимую для поддержания ионного гомеостаза и работы трансмембранных насосов, а пентозофосфатный путь обеспечивает восстановительными эквивалентами ферменты антиоксидантной защиты.

Параметры энергетического обмена определяют метаболическую стратегию клетки, а в случае одноклеточных организмов — и жизненную стратегию. Таким образом, переход Hb из растворимого в мембраносвязанное состояние переключает метаболизм из низко- в высокоэнергетическое и,

таким образом, повышает активную компоненту адаптационной стратегии.

Существует корреляция между энергетическим статусом и объемом клетки. Известно, что изменение объема является оперативным механизмом реагирования клетки на стресс. Эта зависимость не линейная: снижение АТФ до определенного уровня приводит к повышению объема, ниже определенного уровня — к сокращению ниже первоначальной величины [77], что сопровождается изменением устойчивости клетки. Объем является одним из интегральных показателей функционального состояния эритроцита, который рассматривают как функцию состава наружной среды [78].

Два реакционных центра в гемоглобине: гем и β Cys93. Гемоглобин своей внешней поверхностью активно взаимодействует с окружающей средой. Характер этого взаимодействия меняется в зависимости от состояния молекулы. Для Hb характерна высокая структурная и функциональная подвижность, благодаря которой он может существовать в различных равновесных формах. Помимо переходов oxyHb-deoxyHb (R-T-переход) и растворимый Hb-MBHb, в клетке существует равновесие между мономерной, димерной и тетрамерной формами Hb. Нельзя исключить, что внутри эритроцита тетрамеры Hb расположены не хаотично, а организованы в надмолекулярный комплекс, подобный жидкокристаллическому состоянию [79], который может кооперативно реагировать на изменения состава среды и давать целостную реакцию в масштабе клетки.

За равновесие между различными формами Hb отвечают два взаимосвязанных “реакционных центра”: гемовая группа и цистеин бета-субъединиц (β Cys93). Этот доступный растворителю остаток является мишенью для связывания тиоловых реагентов, которые могут изменять сродство к O_2 , кооперативность и чувствительность Hb к изменениям pH [80]. Воздействуя на гем и β Cys93, можно модулировать конформационный R-T-переход, а также смещать равновесие молекулы в сторону увеличения гидрофильности или гидрофобности.

Тетрамерная молекула Hb содержит шесть остатков цистеина Cys93, Cys112 в β -субъединицах и Cys104 в α -субъединицах, из которых только β Cys93 является доступным для действия растворителя. Этот остаток консервативен у всех гемоглобинов позвоночных. Реакционная активность β Cys93 модулируется кислородзависимыми изменениями конформации Hb. У R-конформеров активность этого тиола по отношению к нитрозилирующим и алкилирующим агентам выше [18, 19, 81].

Обсуждается участие Hb в регуляции кислородзависимого метаболизма NO в клетках [82, 83]. Эта концепция основывается на трех свойствах Hb: 1) нитритредуктазная активность гемовой группы в дезоксигенированной форме [84], 2) способность

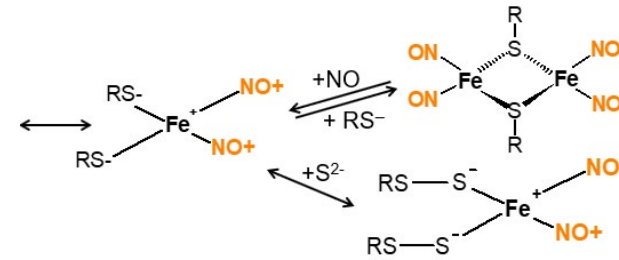
SH-групп βCys93 к обратимому нитрозилированию [85], 3) влияние R-Т-конформационного перехода на реакционную активность SH-групп βCys93 [19]. Однако способностью участвовать в транспорте NO физиологические свойства этого цистеина не исчерпываются. Поскольку этот остаток присутствует в концентрациях на несколько порядков превышающих ферментативные компоненты антиоксидантной системы эритроцитов, то он может участвовать в удалении активных форм кислорода, что было экспериментально подтверждено в работах [86, 87]. Кроме этого, βCys93 может влиять на реакции переноса электронов и снижать продукцию O₂⁻ гемовым железом [88, 89]. Нет сомнений, что тиоловые группы βCys93 являются важным звеном редокс-сигналикации эритроцита, которая осуществляется как через регуляцию количества реакционноактивных соединений [87], так и через взаимодействие Hb с компонентами мембраны [20, 90]. В то же время окисленный βCys93 предложено использовать как биомаркер окислительного стресса [80].

Известно, что поверхностные остатки цистеина (βCys93) Hb участвуют в формировании комплексов с металлами [28, 91–93]. Одним из наиболее изученных таких комплексов являются динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [94–97]. Можно

полагать, что включение тиолов в ДНКЖ может быть одним из способов стабилизации белка и снижения его реакционной способности. В частности, образование ДНКЖ может быть одним из механизмов модулирования реакционной активности белковых тиолов [81]. Образование координационного комплекса с железом блокирует цистеиновые остатки в нормальных условиях и сенсibiliзирует их в условиях электрофильного/окислительного стресса. Это происходит потому, что тиолы в составе комплекса находятся в активной ионизированной форме (в виде тиолат-аниона) и не нуждаются в предварительном депротонировании. ДНКЖ также могут служить “кросс-линкинг”-агентом, образуя в этом случае биядерные комплексы (табл. 3). Например, такие комплексы образуются при участии Fe-S-кластеров редокс-чувствительных белков-датчиков OxyR в бактериях [98]. Возможно, что образование лабильных межбелковых связей посредством формирования биядерных ДНКЖ оказывает стабилизирующее действие на белки в условиях окислительного стресса. Поэтому их можно рассматривать как “тиоловый переключатель”, чувствительный к изменению окислительно-восстановительной среды клетки [99].

Гемоглобин – внутриклеточный “таймер”. Эритроциты, как и многие клетки организма, имеют

Таблица 3. Модификация тиоловых групп под действием активных метаболитов оксида азота

Метаболиты оксида азота	Образуемые продукты
Нитроксил	
RS ⁻ + HNO → RSNHOH → RS(O)NH ₂	Сульфинамиды и дисульфиды, в том числе образованные с участием глутатиона и H ₂ S
R'SH + RSNHOH → R'SSR + NH ₂ OH	
Пероксинитрит и высшие окислы азота	
RS ⁻ + NO ₂ [•] → RS [•] + NO ₂ ⁻ RS [•] + NO → RS-NO	S-нитрозотиолы
RS ⁻ + ONOOH → RS-NO + HOO ⁻	
RSH + N ₂ O ₃ → RS-NO + NO ₂ ⁻ + H ⁺	
RSH + N ₂ O ₄ → RS-NO + NO ₃ ⁻ + H ⁺	
Ионы железа и оксида азота	
2RS ⁻ + 3NO + Fe ²⁺ ↔ 	Моноядерные, биядерные и персульфидные ДНКЖ

автономные часы, регулирующие продолжительность жизни клетки — часы старения, и циркадные часы, регулирующие суточные колебания метаболических параметров [52–54]. И Нб играет важную роль в этом “часовом механизме” эритроцитов.

На протяжении жизни эритроцита постепенно накапливаются окисленные формы Нб — гемихромы (рис. 2), которые связываются с определенным участком Band3, тем самым вызывая его кластеризацию и появление антигенов старения [56]. Гемихромы образуются в результате постоянно проходящего процесса автоокисления oхуНб . Однако в этой последовательности событий есть несколько нерешенных проблем. Непонятно, почему гемихромы образуются и в нормальном эритроците, где есть мощная антиоксидантная защита и ферментативная система, восстанавливающая окисленный Нб (metHb). Не является ли образование гемихромов пусковым механизмом часов старения эритроцитов, ведь автоокисление Нб — это спонтанный процесс, а старение клетки считается запрограммированным? И не может ли оказаться, что случайные неферментативные реакции являются частью биологической программы?

Поскольку на протяжении всего периода жизни эритроцит подвергается действию активных форм кислорода (АФК), постоянно генерируемых гемоглобином, то в данном случае время является эквивалентом дозы или интенсивности окислительного стресса. Окислительные изменения Нб (накопление стабильных гемихромов) отражают не только редокс-условия, но и продолжительность

жизни эритроцита (рис. 2). Иными словами, Нб является внутриклеточным “таймером” [100]. Когда нарушена антиоксидантная защита и образуется больше АФК, клеточные часы идут быстрее, происходит преждевременное старение. Такая ситуация возникает у больных с хронической почечной недостаточностью, наследственным сфероцитозом, псориазом, а также при хранении эритроцитарной массы.

Обнаружение в 2011 г. циркадных ритмов в изолированных эритроцитах человека стало еще одним доводом в пользу существования независимого от транскрипции механизма циркадных часов в клетках млекопитающих, основанных на посттрансляционных процессах в цитоплазме [52]. В настоящее время считается, что основу таких часов составляют окислительно-восстановительные циклы пероксиредоксинов (PrxII). В эритроцитах PrxII является основным антиоксидантным ферментом, эффективно восстанавливающим низкие концентрации пероксида водорода. В процессе каталитического цикла этих белков образуется гиперокисленная форма — $\text{PrxII-SO}_2\text{H}$, количество которой колеблется. Около 1% от общего количества PrxII ежедневно инактивируется, что приводит к постепенному истощению пула PrxII в течение срока жизни эритроцитов [53]. Также с циркадной периодичностью изменяются количества metHb , АТФ, НАД(Ф), НАДФН, K^+ , тетрамерной и димерной форм Нб.

Гемоглобин может претендовать на роль ключевого игрока в генерации циркадных ритмов,

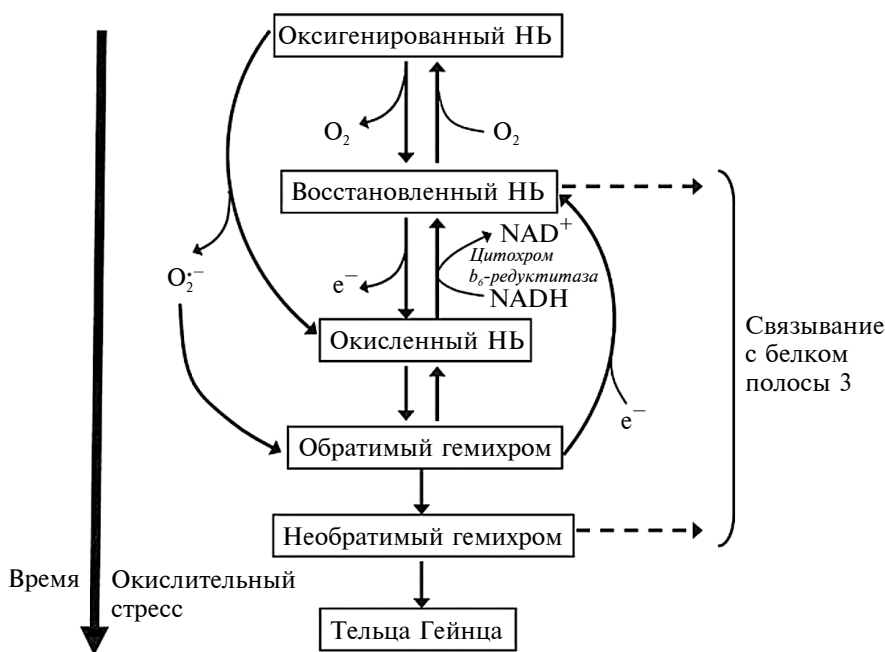


Рис. 2. Превращения гемоглобина в эритроците в зависимости от уровня окислительного стресса или времени функционирования.

поскольку в эритроцитах он является основным источником H_2O_2 . В результате автоокисления $oxyHb$ образуется супероксидный анион-радикал, который ферментативно преобразуется в H_2O_2 . Однако причины суточных колебаний H_2O_2 и, следовательно, $PrxII-SO_2H$ неизвестны. Существует гипотеза, что внутриклеточная концентрация H_2O_2 зависит от равновесия димерной и тетрамерной форм Hb , обладающих разной способностью к автоокислению. Скорость автоокисления димерной формы Hb в 13 раз превышает скорость окисления тетрамерной формы [52].

Можно предположить, что в механизме циркадного хронометрирования задействован комплекс Hb -Band 3. Поскольку гемихромы конкурируют с $PrxII$ за центры связывания с CDB3, то в условиях окислительного стресса снижается содержание связанной формы $PrxII$ [101, 102].

ОКСИД АЗОТА И МЕТИЛГЛИОКСАЛЬ КАК ФАКТОРЫ АДАПТАЦИИ ЭРИТРОЦИТА

Существующее внутри клетки равновесие между разными формами Hb определяет физико-химические параметры цитоплазмы и энергетический обмен. С помощью веществ, оказывающих влияние на это равновесие, можно настраивать клетку к изменениям физиологического состояния. В качестве таких модуляторов физиологических состояний эритроцита могут выступать вещества с выраженными электроноакцепторными свойствами, которые способны обратимо взаимодействовать с SH-группами [103, 104]. Наибольший интерес представляют такие физиологические метаболиты, как оксид азота (NO) и метилглиоксаль (MG). Эти вещества являются естественными метаболитами, они образуются как в самих эритроцитах, так и присутствуют в плазме. В зависимости от концентрации они могут оказывать как токсическое, так и сигнально-регуляторное действие [104–106]. Сигнальное действие NO и его метаболитов изучено в гораздо большей степени, чем MG. Изучение MG в контексте формирования физиологического состояния клетки представляет интерес в связи с увеличением концентрации этого метаболита в эритроцитах при диабетической гипергликемии [107, 108].

Оксид азота в клетке существует в связанной форме, чаще всего в виде нитрозотиолов (RS-NO) и ДНКЖ. ДНКЖ включают три компонента: NO-группу, двухвалентное железо и лиганды [97], в качестве которых могут выступать различные физиологические вещества: глутатион, цистеин, липоевая кислота [109], карнозин [110], эрготионеин, а также продукты модификации аминокислот метилглиоксаль [95, 111, 112]. В эритроцитах наиболее вероятно образование низкомолекулярных ДНКЖ с глутатионовыми и эрготионеиновыми лигандами, поскольку их содержание в клетке

достаточно велико. Если ДНКЖ с глутатионом (ДНКЖ-GS) изучены достаточно хорошо, то комплексы с эрготионеиновыми и карнозиновыми лигандами изучены намного хуже. Имеются данные, свидетельствующие о цитопротекторном и антиоксидантном действии карнозина и эрготионеина [113, 114], которое может быть обусловлено способностью этих соединений связывать ионы двухвалентных металлов.

ДНКЖ являются универсальными регуляторами различных биохимических и физиологических процессов [97]. Они поддерживают прооксидантно-антиоксидантное равновесие в клетке благодаря антиоксидантному, антирадикальному и хелатному действиям, показанных в работах [94, 95, 109, 115–117].

Глутатионовые ДНКЖ оказывают стабилизирующее действие на эритроциты. ДНКЖ-GS повышают эластичность эритроцитов и тем самым улучшают микроциркуляцию [118]. Известно также, что NO участвует в регуляции выживаемости эритроцитов [119]. ДНКЖ также участвуют в регуляции выживаемости эритроцитов, поскольку являются донором NO [119].

В модельных экспериментах было исследовано влияние ДНКЖ-GS на устойчивость суспензии эритроцитов к индуцированному хлорноватистой кислотой гемолизу [115]. Предобработка эритроцитов комплексами приводила к расширению зоны дозозависимого ответа клеток (рис. 1, кривая 2). Во всем диапазоне используемых концентраций окислителя в предобработанных комплексами эритроцитах уровень гемолиза был ниже, чем в контрольном образце. Можно предположить, что стабилизирующее действие ДНКЖ-GS связано с переводом клеток на более низкий уровень реактивности. Клетки становятся менее чувствительны, но более устойчивы к повреждению.

Повышение осмотической резистентности эритроцитов было также показано при обработке их метилглиоксальем [120]. В связи с этим можно предположить, что существует определенный концентрационный диапазон NO и MG, в пределах которого устойчивость эритроцитов возрастает.

Наблюдаемое цитопротекторное действие ДНКЖ может быть связано как с антиоксидантным и антирадикальным действием [94, 95, 109, 115–117], так и с модификацией тиоловых групп мембранных рецепторов и белков цитоскелета. С помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) было показано, что ДНКЖ-GS эффективно перехватывают $HOCl$. Однако, принимая во внимание используемые в эксперименте низкие микромолярные концентрации ДНКЖ-GS, можно предположить, что наиболее вероятным является сигнально-регуляторное действие этих комплексов, которое может реализоваться в том числе и с участием Hb .

Тот факт, что сама по себе хлорноватистая кислота в одном интервале концентраций стабилизирует эритроциты, а в другом — индуцирует гемолиз (рис. 1, кривая 1), может быть объяснен двухфазным характером реакции. Следуя этой логике, был поставлен эксперимент, в котором проводили предынкубацию эритроцитов с HOCl , взятой в концентрации, вызывающей максимальное стабилизирующее действие на клетки (200 мкМ) в течение 20 мин. После этого клетки обрабатывали новой порцией 200 мкМ HOCl . Хлорноватистая кислота в концентрации 400 мкМ вызывала гемолиз (рис. 3, столбец 4), однако та же доза, внесенная дробно, оказывала противоположное действие (рис. 3, столбец 3). Феномен предадаптации живых систем низкими сублетальными дозами хорошо известен и применяется в медицинской практике (закон Арндта—Шульца, см. выше).

Хлорноватистая кислота также способна в определенных дозах оказывать цитопротекторное действие. Однако в отличие от ДНКЖ-GS разница между биологически активной дозой и повреждающей у нее намного меньше. Если ДНКЖ-GS в концентрации 400 мкМ оказывает положительный эффект на клетки, то HOCl в этой концентрации индуцирует гемолиз. Таким образом, можно считать ДНКЖ-GS эндогенным биорегулятором естественной резистентности, оказывающим модулирующее действие на уровне цитоплазмы и белок-липидных взаимодействий. Полученные результаты согласуются с ранее установленными фактами положительного влияния ДНКЖ на метаболизм эритроцитов [118].

Фазные изменения состояния эритроцитов в зависимости от дозы воздействия, к сожалению, не

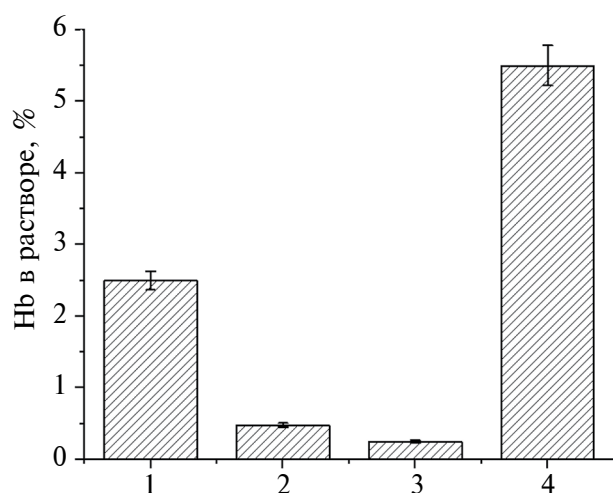


Рис. 3. Ингибирование окислительного гемолиза эритроцитов: эффект предадаптации к окислителю: 1 — контроль, 2 — 200 мкМ HOCl , 3 — 200 мкМ HOCl (20 мин инкубации) + 200 мкМ HOCl , 4 — 400 мкМ HOCl .

всегда учитываются исследователями, работающими над повышением стабильности эритроцитов, хотя они часто сталкиваются с наличием зон стабилизации и дестабилизации.

Предобработка низкими дозами реакционно-активных соединений может изменить характеристики зависимости “доза—ответ”, например, увеличить зону стабилизации. Для эритроцитов показано стабилизирующее действие низких доз оксида азота [118], озона [121], иона уранила [122], мелатонина [123]. Эти вещества наряду с ДНКЖ-GS можно считать адаптогенами.

Особенностью ДНКЖ как цитопротекторов (адаптогенов) является низкий порог эффективной дозы (2 мкМ) в отличие, например, от α -токоферола и аскорбиновой кислоты, оказывающих 100% ингибирование окислительного гемолиза только начиная с концентрации 100 мкМ [124]. Поэтому изучение защитного влияния ДНКЖ на эритроциты важно не только для понимания механизмов, лежащих в основе регуляции жизнедеятельности клетки, но и имеет практическую значимость для разработки лекарственных препаратов.

Терапевтический эффект низких доз известен еще со времен Парацельса. В настоящее время разнонаправленное действие различных факторов на клетку объясняют с позиций концепции гормезиса [45], которая соответствует универсальному двухфазному ответу клетки на возрастающий стимул [10] (см. выше).

Еще одним эндогенным веществом, влияющим на метаболизм клетки, является активное дикарбонильное соединение — метилглиоксаль [105]. Метилглиоксаль образуется при деградации конъюгатов глюкозы с белком и перекисного окисления липидов. В статьях [107, 108, 125] описаны пути образования этого метаболита в эритроцитах.

Если роль NO и O_2^- в клеточной редокс-сигнализации изучена хорошо, то о механизмах регуляторного действия MG известно намного меньше, хотя еще в середине XX века Сент-Дьёрдьи указал на наличие регуляторных свойств у кетонов и альдегидов. Особое значение в клеточной сигнализации он придавал метилглиоксаль [14]. MG содержит одновременно альдегидную и кетонную группы, что сильно увеличивает его электроноакцепторную способность. Он легко образует нестабильные аддукты (тиогемиацетали) с SH-группами глутатиона и других биомолекул [126]. Связывая реакционноактивные тиолы, MG уменьшает пул SH-групп, способных вступать в донорно-акцепторные взаимодействия, то есть оказывает десенсибилизирующее действие на клетку. Поэтому MG, также как и NO , можно рассматривать в качестве вещества-биорегулятора.

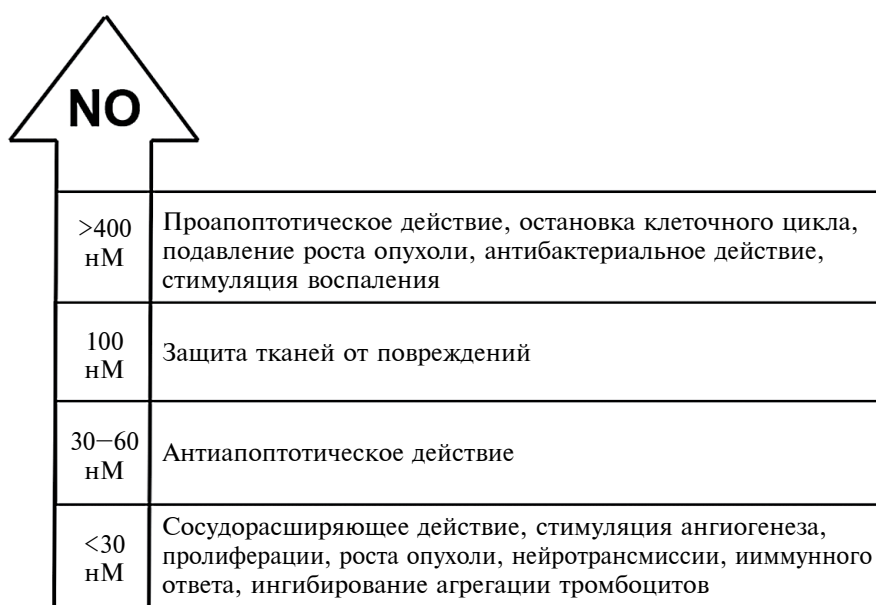
В эритроцитах больных диабетом обнаружено снижение уровня GSH за счет его связывания

с MG [127]. Такие эритроциты предрасположены к апоптозу [128]. Способность MG останавливать пролиферацию и индуцировать апоптоз показана для многих эукариотических и прокариотических клеток [105]. MG имеет шесть сайтов связывания с молекулой Hb: α Arg92, β Lys66, β Arg30 и β Lys144 образуют карбоксиэтил, α Arg92 и β Arg30 гидроимидазолон [129].

В функционировании MG и NO можно выявить общие черты. Оба вещества являются физиологическими метаболитами, образующимися во всех про- и эукариотических клетках. Для них доказано взаимодействие с сигнальными путями, регулирующими различные физиологические функции клетки: пролиферацию, апоптоз, выработку факторов роста и др. MG и NO оказывают разнонаправленное действие на клетки, которое определяется их концентрацией (рис. 4) и физиологическим состоянием клетки. На молекулярном уровне сигнально-регуляторное действие этих веществ во многом реализуется через изменения в цистеиновом протеоме [92, 104]. Следует отметить, что в эритроците в норме концентрации этих веществ поддерживаются в определенном диапазоне, в то время как концентрационные флуктуации могут иметь сигнально-регуляторное значение.

Биологическое действие оксида азота основано на взаимодействии с гемовым железом и тиоловыми группами цистеина. MG, и NO повышают сродство Hb к кислороду, то есть могут выступать в роли “аллостерических эффекторов” [130, 131]. Благодаря этому эффекту они смещают равновесие пула молекул Hb в сторону R-конформации.

Для эритроцитов гипоксия выступает как стресс-фактор, вызывающий в клетках адаптивное метаболическое перепрограммирование [13, 132]. В условиях гипоксии увеличивается образование $O_2^{\cdot-}$ в реакции автоокисления Hb в ходе активной дезоксигенации (рис. 1) [133, 134] и NO в нитриредуктазной реакции, катализируемой deoxyHb [84, 135]. Внутриклеточная концентрация этих соединений тем выше, чем глубже гипоксия и выше доля deoxyHb. Эти реакционноактивные соединения могут вступать в окислительно-восстановительные взаимоотношения друг с другом, а также с SH-группами низко- и высокомолекулярных тиолов, что приводит к сдвигам в тиол-дисульфидном равновесии. Например, в реакции NO и $O_2^{\cdot-}$ образуется пероксинитрит ($ONOO^-$), который окислительно модифицирует белки и липиды [136]. Как правило, активные формы кислорода и активные формы азота являются побочными продуктами аэробного метаболизма. Эритроциты являются исключением, поскольку именно в условиях гипоксии возрастает продукция $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$ и др. Эти соединения участвуют в окислительно-восстановительной передаче сигналов, необходимой для нормальной клеточной физиологии за счет регуляции функции белков, имеющих редокс-чувствительные тиолы [91, 137–139]. В эритроците высокие уровни NO приводят к изменению состояния тиоловых групп Hb [137–139] и белков цитоскелета [140]. Сигнально-регуляторное действие NO на эритроциты хорошо известно. Так, показано, что NO сохраняет деформируемость эритроцитов в условиях окислительного стресса [141]. В табл. 3 представлены основные реакции тиоловых групп под действием активных метаболитов NO.



>400 нМ	Проапоптотическое действие, остановка клеточного цикла, подавление роста опухоли, антибактериальное действие, стимуляция воспаления
100 нМ	Защита тканей от повреждений
30–60 нМ	Антиапоптотическое действие
<30 нМ	Сосудорасширяющее действие, стимуляция ангиогенеза, пролиферации, роста опухоли, нейротрансмиссии, иммунного ответа, ингибирование агрегации тромбоцитов

Рис. 4. Зависимость биологического эффекта оксида азота от его концентрации. Рисунок составлен по данным [106].

Как было показано, в том числе и в наших экспериментах, в системе, моделирующей карбонильный и нитрозативный стресс, происходит образование радикальных интермедиатов (анион-радикал MG , O_2^- и ONOO^-) [142], а также окисленных и активированных форм тиолов [143]. Активированные формы тиолов (тиолят-анион и сульфеновая кислота) являются нестабильными промежуточными продуктами окислительной модификации тиоловых групп [92, 144, 145]. Эти интермедиаты более реакционноактивны по отношению к электрофилам [99]. Сульфеновые кислоты действуют как мягкий электрофил и слабый нуклеофил [92]. Можно предположить, что появление активированных тиолов повышает чувствительность клетки, в то время как окисление и блокада тиолов способствуют снижению чувствительности (возбудимости). Таким образом, реакционноактивные соединения посредством влияния на цистеиновый протеом модулируют физиологическое состояние клетки [91, 137–139].

Реактивность эритроцитов. Эритроцит в своих морфофункциональных изменениях отражает функциональное состояние системы крови. Физиологическое состояние эритроцитов связано с определенным состоянием организма в условиях нормы и патологии. Изменение морфо-функциональных свойств эритроцитов происходит под влиянием физической нагрузки, гипоксии, эндотоксинов, фармакологических химиопрепаратов [21, 23].

В настоящее время предлагают рассматривать реактивность мембран эритроцита в качестве индикатора стрессового состояния или адаптационной реакции организма на клеточно-молекулярном уровне. Выявлено четыре типа адаптивных вариантов реактивности клеточных мембран эритроцитов [1, 2]. Существуют разные способы оценки реактивности эритроцитов: определение устойчивости их суспензии к окислительному или осмотическому гемолизу, оценка чувствительности мембран к экзогенным биорегуляторам, изучение липидного состава мембран, определение электрофоретической подвижности эритроцитов. В качестве еще одного индикатора реактивности эритроцитов мы предлагаем использовать уровень МВНб [51].

Конфликт адаптационных стратегий. Любое длительное фармакологическое воздействие изменяет функциональное состояние клеток ткани. Измененные клетки обнаруживают извращенную реакцию на воздействие биорегуляторов. Сдвиги функциональных состояний клеток, изменение их чувствительности и реактивности — это следствие действия эволюционно выработанных механизмов клеточной адаптации, призванных предохранять и поддерживать специфическую функцию клеток. Однако адаптация клетки не всегда происходит в интересах целостного организма. Зачастую адаптация на клеточном уровне сопровождается низкоэнергетическим сдвигом, который влечет за

собой нарушение структуры мембраны, цитоскелета, ионтранспортирующих механизмов, снижение мембранного потенциала. Весь этот комплекс изменений направлен на уменьшение чувствительности и повышение резистентности клетки.

В случае пребывания клетки в состоянии глубокого метаболического угнетения, возникает необходимость выработки устойчивых системных компенсаторных механизмов, которые вернули бы всю систему в состояние равновесия. Платой за это новое состояние равновесия могут быть изменения в работе гомеостатирующих регуляторных контуров высшего уровня. В результате конфликта адаптационных стратегий разных уровней организации, клеточного и организменного, могут возникнуть патологические состояния, получившие название “болезни компенсации”. К таким болезням относят широко распространенные хронические заболевания сердечно-сосудистой системы как атеросклероз и артериальную гипертензию. Оба заболевания имеют общую патогенетическую основу — изменение структуры и функции клеточных мембран [146].

Согласно мембранной теории развития артериальной гипертензии и инсулинорезистентности, нарушение трансмембранного транспорта моновалентных катионов изменяет реактивность клеток, составляющих основу сосудистой стенки [146]. Такие клетки не способны адекватно отвечать на любые раздражители извне и изнутри, они отвечают либо повышенным возбуждением, либо глубоким торможением. Нарушение трансмембранного ионного транспорта может быть генетически детерминированным процессом, но также может возникать вследствие реализации механизма клеточной адаптации.

В качестве диагностического маркера первичной артериальной гипертензии используют скорость $\text{Na}^+ - \text{Li}^+$ -противотранспорта (НЛП) в мембране эритроцитов. Нарушение НЛП в эритроцитах может происходить в случае включения пассивной программы адаптации, например, при изменении состава плазмы. Это предположение согласуется с теми фактами, что мембранные нарушения на клеточном уровне сопровождаются увеличением ионов кальция и натрия в клетке, снижением продукции АТФ, увеличением микровязкости, сокращением объема, изменением нормы-реакции клетки. Перечисленные отклонения присущи обратимо трансформированным формам эритроцитов. В контексте этих соображений изучение адаптационных изменений эритроцитов поможет более глубокому пониманию механизмов, лежащих в основе развития атеросклероза и артериальной гипертензии.

* * *

Подводя итоги, необходимо обозначить следующие перспективы изучения роли Нб в формировании метаболического состояния эритроцитов и

влияния на этот процесс доноров NO и метилгли-оксала. В первую очередь возникает необходимость в разработке тест-системы для определения уровня реактивности эритроцитов. С помощью такой тест-системы можно будет выделять адаптивные варианты (фенотипы) эритроцитов, образующиеся в различных условиях. Для этого необходимо установить взаимосвязь между уровнем МВНб и уровнем реактивности эритроцитов в модельных экспериментах и в пробах крови, взятых у здоровых и больных людей. Также необходимо изучить влияние различных эндогенных электрофильных соединений (в том числе MG и доноров NO) на реактивность и некоторые показатели метаболического состояния эритроцитов.

Можно надеяться, что изучение этих аспектов послужит основой для разработки концепции, объясняющей адаптогенное действие низких уровней реакционноактивных электрофильных соединений на клетку. Кроме этого, вызывает интерес участие таких метаболитов в реализации программы адаптации и реабилитации эритроцитов, консервированных или циркулирующих в условиях различных патологий. Представленные в статье данные и сделанные на их основе обобщения помогут лучше понять роль Нб в устройстве биологических часов эритроцита.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Проведение работы не поддерживалось внешними источниками финансирования и грантами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kamada T., Tokuda S., Aozaki S., Otsuji S. // J. Appl. Physiol. 1993. V. 74. P. 354–358.
2. Parthasarathi K., Lipowsky H.H. // Am. J. Physiol. 1999. V. 277. P. H2145–H2157.
3. Petibois C., Deleris G. // Arch. Med. Res. 2005. V. 36. P. 524–531.
4. Mohandas N., Gallagher P.G. // Blood. 2008. V. 112. P. 3939–3948.
5. Karaman Yu.K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V. // International Journal of Applied and Fundamental Research. 2009. V. 2. P. 15–16.
6. Зайцева О.И., Петрова И.А., Эверт Л.С., Колодяжная Т.А., Деревцова С.Н. // Вестник новых медицинских технологий. 2013. Т. 20. № 2. С. 69–72.
7. Martusevich A.A., Deryugina A.V., Martusevich A.K. // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2016. V. 12. № 3. P. 5–11.
8. Barshtein G., Livshits L., Gural A., Arbell D., Barkan R., Pajic-Lijakovic I., Yedgar S. // Int. J. Mol. Sci. 2024. V. 25. № 11. e5814. <https://doi.org/10.3390/ijms25115814>
9. Sae-Lee W., McCafferty C.L., Verbeke E.J., Havugimana P.C., Papoulas O., McWhite C.D., et al. // Cell. Rep. 2022. V. 40. № 3. e111103. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111103>
10. Насонов Д.Н. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. М.: Изд-во Академии наук СССР, 1962. 426 с.
11. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука, 1985. 318 с.
12. Matveev V.V. // Cell. Mol. Biol. 2005. V. 51. P. 715–723.
13. Jin X., Zhang Y., Wang D., Zhang X., Li Y., Wang D., Liang Y., Wang J., Zheng L., Song H., Zhu X., Liang J., Ma J., Gao J., Tong J., Shi L. // iScience. 2024. V. 27. № 4. e109315. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109315>
14. Сент-Дьёрдьи А. Биоэлектроника. Исследование в области клеточной регуляции, защитных механизмов и рака. М.: Мир, 1971. 80 с. (Szent-Györgyi A. Bioelectronics: A Study in Cellular Regulations, Defense, and Cancer. New York: Academic Press, 1968. 89 p.)
15. Lang E., Lang F. // Bio Med. Res. Int. 2015. V. 2015. e513518. <https://doi.org/10.1155/2015/513518>
16. Mihailescu M.-R., Russu I.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 7. P. 3773–3777.
17. Benesch R.E., Benesch R. // Biochemistry. 1962. V. 1. № 5. P. 735–738.
18. Morell S.A., Hoffman P., Ayers V.E., Taketa F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. V. 48. P. 1057–1061.
19. Aboluwoye C.O., Adebayo E.A., Egunlusi D., Tijani K., Bolaji S., Olayinka S. // Bull. Chem. Soc. Ethiop. 1998. V. 12. P. 17–25.
20. Chu H., Breite A., Ciruolo P., Franco R.S., Low P.S. // Blood. 2008. V. 111. № 2. P. 932–938.
21. Agroyannis B., Dalamangas A., Tzanatos H., Fourtounas C., Kopelias I., Koutsikos D.J. // Appl. Physiol. 1985. V. 80. № 2. P. 711–712.
22. Reinhart W.H., Schulzki T. // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2011. V. 49. № 1–4. P. 451–461.
23. Chowdhury A., Dasgupta R., Majumder S.K. // J. Biomed. Opt. 2017. V. 22. № 10. P. 1–9.
24. Мороз В.В., Голубев А.М., Черныш А.М., Козлова Е.К., Васильев Б.Ю., Гудкова О.Е. и др. // Общая реаниматология. 2012. Т. 8. С. 5–12.
25. Mustafa I., Marwani A.A., Nasr K.M., Kano N.A., Hadwan T. // BioMed. Res. Int. 2016. V. 2016. e4529434. <https://doi.org/10.1155/2016/4529434>
26. Кидалов В.Н., Сясин Н.И., Хадарцев А.А. // Вестник новых медицинских технологий. 2005. Т. 7. С. 6–10.
27. Chowdhury A., Dasgupta R., Majumder S.K. // J. Biomed. Opt. 2017. V. 22. № 10. P. 1–9.
28. Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Yakunin S.N., Topunov A.F. // Biochemistry (Mosc.). 2024. V. 89. Suppl. 1. P. S180–S204.
29. Bychkova V.E., Dolgikh D.A., Balobanov V.A., Finkelstein A.V. // Molecules. 2022. V. 27. № 14. e4361. <https://doi.org/10.3390/molecules27144361>

30. Gupta M.N., Uversky V.N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 3. e2424.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032424>
31. Iram A., Alam T., Khan J.M., Khan T.A., Khan R.H., Naeem A. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 8. e72075.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.007207>
32. Dave S., Mahajan S., Chandra V., Gupta P. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2011. V. 49. № 4. P. 536–542.
33. Iram A., Naeem A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 533. P. 69–78.
34. Samuel P.P., White M.A., Ou W.C., Case D.A., Phillips Jr. G.N., Olson J.S. // *Biophys. J.* 2020. V. 118. № 6. P. 1381–1400.
35. Jennings P.A., Wright P.E. // *Science*. 1993. V. 262. P. 892–896.
36. Rifkind J.M., Abugo O., Levy A., Heim J. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 231. P. 449–480.
37. Culbertson D.S., Olson J.S. // In: *Protein Folding and Metal Ions: Mechanisms, Biology, Disease.* / Ed. P. Wittung-Stafshede, C.M. Gomes. Abingdon-on-Thames, UK: Taylor and Francis, 2010. P. 97–122.
38. Андреюк Г.М., Кусель М.А. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. № 4. С. 290–293.
39. Ioannou A., Varotsis C. // *PLoS One*. 2017. V. 12. e0188095.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188095>
40. Arnold E.V., Bohle D.S., Jordan P.A. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 4750–4756.
41. Shikama K. // *Chem. Rev.* 1998. V. 98. P. 1357–1373.
42. Sugawara Y., Kadono E., Suzuki A., Yukuta Y., Shibasaki Y., Nishimura N. et al. // *Acta Physiol. Scand.* 2003. V. 179. P. 49–59.
43. Vergara A., Vitagliano L., Verde C., di Prisco G., Mazzarella L. // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 425–444.
44. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Bindar V.N., Topunov A.F. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. № 2. P. 83–98.
45. Браун А.Д., Моженко Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука, 1987. 232 с.
46. Calabrese V., Cornelius C., Dinkova-Kostova A.T., Calabrese E.J., Mattson M.P. // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 13. P. 1763–1811.
47. Agathokleous E., Liu C.-J., Calabrese E.J. // *Soil & Environmental Health*. 2023. V. 1. № 1. e100003.
<https://doi.org/10.1016/j.seh.2023.100003>
48. Agutter P.S. // *Bioessays*. 2007. V. 29. № 4. P. 324–333.
49. Kruchinina M.V., Gromov A.A. // *Atheroscler. J.* 2018. V. 18. № 2. P. 165–179.
50. Huisjes R., Bogdanova A., van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., van Wijk R. // *Front. Physiol.* 2018. V. 9. e656.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656>
51. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // *Biochemistry (Moscow)*. 2018. V. 83. № 12–13. P. 1575–1593.
52. O'Neill J.S., Reddy A.B. // *Nature*. 2011. V. 469. P. 498–503.
53. Cho C.S., Yoon H.J., Kim J.Y., Woo H.A., Rhee S.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 12043–12048.
54. Henslee E.A., Crosby P., Kitcatt S.J., Parry J.S.W., Bernardini A., Abdallat R.G., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. e1978.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02161-4>
55. Mishra K., Chakrabarti A., Das P.K. // *J. Phys. Chem. B*. 2017. V. 121. P. 7797–7802.
56. Welbourn E.M., Wilson M.T., Yusof A., Metodiev M.V., Cooper C.E. // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 103. P. 95–106.
57. Shimo H., Arjunan S.N.V., Machiyama H., Nishino T., Suematsu M., Fujita H., et al. // *PLoS Comput. Biol.* 2015. V. 11. № 6. e1004210.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004210>
58. Segal M.F., Chu H., Christian J., Low P.S. // *Biochem.* 2012. V. 51. P. 3264–3272.
59. Sharma R., Premachandra B.R. // *Biochem. Med. Metab. Biol.* 1991. V. 46. P. 33–44.
60. Chan E., Desforges J.F. // *Br. J. Haematol.* 1976. V. 33. № 3. P. 371–378.
61. Datta P., Chakrabarty S., Chakrabarty A., Chakrabarty A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1778. P. 1–9.
62. Demehin A.A., Abugo O.O., Jayakumar J.R., Rifkind J.M. // *Biochem.* 2002. V. 41. P. 8630–8637.
63. Sullivan S.G., Stern A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 774. P. 215–220.
64. Zavodnik I.B., Lapshina E.A., Rekawiecka K., Zavodnik L.B., Bartosz G., Bryszewska M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1421. P. 306–316.
65. Nagababu E., Mohanty J.G., Bhamidipaty S., Ostera G.R., Rifkind J.M. // *Life Sci.* 2010. V. 86. P. 133–138.
66. Kriebardis A.G., Antonelou M.H., Stamoulis K.E., Economou-Petersen E., Margaritis L.H., Papassideri I.S. // *J. Cell. Mol. Med.* 2007. V. 11. P. 148–155.
67. Luneva O.G., Sidorenko S.V., Ponomarchuk O.O., Tverskoy A.M., Cherkashin A.A., Rodnenkov O.V. et al. // *Cell. Physiol. Biochem*. 2016. V. 39. № 1. P. 81–88.
68. Castagnola M., Messana I., Sanna M.T., Giardina B. // *Blood Transfus.* 2010. V. 8. P. 53–58.
69. Jarolim P., Lahav M., Liu S.C., Palek J. // *Blood*. 1990. V. 76. P. 2125–2131.
70. Knutton S., Finean J.B., Coleman R., Limbrick A.R. // *J. Cell Sci.* 1970. V. 7. P. 357–371.
71. Комиссарчик Я.Ю., Левин С.В., Свиридов Б.Е., Сабалаускас И.Ю., Айдитите Г.С. // *Общие механизмы клеточных реакций на повреждающие воздействия*. Л.: Институт цитологии, 1977. С. 29–31.
72. Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Куприна Н.П., Филиппова О.Н., Розов О.А., Акимов В.В., Бас В.В. // *Современные наукоемкие технологии*. 2004. № 6. С. 104.
73. Ferru E., Giger K., Pantaleo A., Campanella E., Grey J., Ritchie K., Vono R., Turrini F., Low P.S. // *Blood*. 2011. V. 117. P. 5998–6006.
74. Pantaleo A., Ferru E., Pau M.C., Khadjavi A., Mandili G., Mattè A. et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. e6051093.
<https://doi.org/10.1155/2016/6051093>
75. Chu H., Low P.S. // *Biochem. J.* 2006. V. 400. P. 143–151.
76. Weber R.E., Voelter W., Fago A., Echner H., Campanella E., Low P.S. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. V. 287. P. 454–464.

77. Weed R.I., LaCelle P.L., Merrill E.W. // J. Clin. Invest. 1969. V. 48. P. 795–809.
78. Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонов И.С., Пивоваров И.О. // Биологические мембраны. 2009. Т. 26. С. 163–179.
79. Dybas J., Bokamper M.J., Marzec K.M., Mak P.J. // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2020. V. 239. e118530. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118530>
80. Alayash A.I. // Lab. Invest. 2021. V. 1. P. 4–11.
81. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 5. P. 512–520.
82. Gladwin M.T., Ognibene F.P., Pannell L.K., Nichols J.S., Pease-Fye M.E., Shelhamer J.H., Schechter A.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 18. P. 9943–9948.
83. Stamler J.S., Singel D.J., Piantadosi C.A. // Nat. Med. 2008. V. 14. P. 1008–1009.
84. Huang K.T., Keszler A., Patel N., Patel R.P., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., Hogg N. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. P. 31126–31131.
85. Xu X., Cho M., Spencer N.Y., Patel N., Huang Z., Shields H. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 11303–11308.
86. Isbell T.S., Sun C.W., Wu L.C., Teng X., Vitturi D.A., Branch B.G., et al. // Nat. Med. 2008. V. 14. P. 773–777.
87. Vitturi D.A., Sun C.-W., Harper V.M., Thrash-Williams B., Cantu-Medellin N., Chacko B.K., et al. // Free Radic. Biol. Med. 2013. V. 55. P. 119–129.
88. Balagopalakrishna C., Abugo O.O., Horsky J., Manoharan P.T., Nagababu E., Rifkind J.M. // Biochemistry. 1998. V. 37. P. 13194–13202.
89. Bonaventura C., Godette G., Tesh S., Holm D.E., Bonaventura J., Crumbliss A.L. et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 5499–5507.
90. Jacob H.S., Brain M.C., Dacie J.V. // J. Clin. Invest. 1968. V. 47. № 12. P. 2664–2677.
91. Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. // Chem. Biol. 2003. V. 10. P. 677–693.
92. Paulsen C.E., Carroll K.S. // Chem. Rev. 2013. V. 113. № 7. P. 4633–4679.
93. Novikova N.N., Kovalchuk M.V., Yurieva E.A., Kononov O.V., Stepina N.D., Rogachev A.V. et al. // J. Phys. Chem. B. 2019. V. 123. № 40. P. 8370–8377.
94. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. // Methods Enzymol. 2008. V. 436. P. 445–461.
95. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Topunov A.F. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 1. e168. <https://doi.org/10.3390/ijms24010168>
96. Bosworth C.A., Toledo J.C.Jr., Zmijewski J.W., Li Q., Lancaster J.R. Jr. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 4671–4676.
97. Vanin A.F. Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms. Cambridge, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2019. 266 p. ISBN: 978-1-5275-3906-8
98. Seth D., Hausladen A., Stamler J.S. // Antioxid. Redox Signal. 2020. V. 32. № 12. P. 803–816.
99. Schlecht S., Fleming H., Parks K. // ChemRxiv. 2023. Preprint 2023–05–18. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-wb9m7>
100. Badior K.E., Casey J.R. // IUBMB Life. 2018. V. 70. P. 32–40.
101. Matte A., Bertoldi M., Mohandas N., An X., Bugatti A., Brunati A.M. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2013. V. 55. P. 27–35.
102. Bayer S.B., Low F.M., Hampton M.B., Winterbourn C.C. // Free Radic. Res. 2016. V. 50. P. 1329–1339.
103. Long M.J., Aye Y. // Chem. Res. Toxicol. 2016. V. 29. № 10. P. 1575–1582.
104. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. Suppl. 1. P. S206–S224.
105. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 3. P. 273–289.
106. Hsiao H.Y., Chung C.W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.T. // Dalton Trans. 2019. V. 48. P. 9431–9453.
107. Rabbani N., Thornalley P.J. // Diabetes. 2014. V. 63. P. 50–52.
108. Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Topunov A.F. // Antioxidants. 2021. V. 10. № 2. e253. <https://doi.org/10.3390/antiox10020253>
109. Pugachenko I.S., Nasybullina E.I., Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. № 5. P. 561–569.
110. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 24. e17236. <https://doi.org/10.3390/ijms242417236>
111. Shumaev K.B., Gubkina S.A., Vanin A.F., Burbaev D.Sh., Mokh V.P., Topunov A.V., Ruuge E.K. // Biophysics. 2013. V. 58. № 2. P. 172–177.
112. Fu T.-T., Shen L. // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. e850813. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.850813>
113. Cheah I.K., Halliwell B. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1822. P. 784–793.
114. Malathy D., Anusha D., Karthika K., Punnaigai K. // J. Clin. Diagn. Res. 2023. V. 17. № 7. P. FC01–FC05.
115. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O., Grigoryeva D., Panasenkov O.M., Vanin A. et al. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. V. 2019. e2798154. <https://doi.org/10.1155/2019/2798154>
116. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2021. V. 15. № 4. P. 313–319.
117. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 24. e13649. <https://doi.org/10.3390/ijms222413649>
118. Шамова Е.В., Бичан О.Д., Дрозд Е.С., Горудко И.В., Чужик С.А., Шумаев К.Б. и др. // Биофизика. 2011. Т. 56. № 2. С. 265–271.
119. Nicolay J.P., Liebig G., Niemoeller O.M., Koka S., Ghashghaieina M., Wieder T. et al. // Pflugers Arch. 2008. V. 456. P. 293–305.
120. Lankin V., Belova E., Tikhaze A.K. // Biophysics. V. 62. № 2. P. 252–255.

121. Белых И.А., Воловельская Е.Л., Зинченко В.Д. // Проблемы криобиологии. 2007. Т. 17. С. 237–242.
122. Шевченко О.Г. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 4. С. 377–384.
123. Tesoriere L., D'Arpa D., Conti S., Giaccone V., Pintauro A.M., Livrea M.A. // Pineal Research. 1999. V. 27. P. 95–105.
124. Mendanha S.A., Anjos J.L.V., Silva A.H.M., Alonso A. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2012. V. 45. P. 473–481.
125. Phillips S.A., Thornalley P.J. // Biochem. Soc. Trans. 1993. V. 21. № 2. e163s. <https://doi.org/10.1042/bst021163s>
126. Zeng J., Davies M.J. // Chem. Res. Toxicol. 2005. V. 18. P. 1232–1241.
127. Beard K.M., Shangari N., Wu B., O'Brien P.J. // Mol. Cell Biochem. 2003. V. 252. P. 331–338.
128. Nicolay J.P., Liebig G., Niemoeller O.M., Koka S., Ghashghaiein M., Wieder T. et al. // Life Sci. 2010. V. 86. P. 133–138.
129. Chen H.-J.C., Chen Y.-C., Hsiao C.-F., Chen P.-F. // Chem. Res. Toxicol. 2015. V. 28. P. 2377–2389.
130. McMahon T.J., Stone A.E., Bonaventura J., Stamler J.S. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999. V. 159. № 3. P. A352.
131. Stepuro T.L., Zinchuk V.V. // J. Physiol. Pharmacol. 2006. V. 57. № 1. P. 29–38.
132. D'Alessandro A., Xia Y. // Curr. Opin. Hematol. 2020. V. 27. № 3. P. 155–162.
133. Misra H.P., Fridovich I. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. P. 6960–6962.
134. Kiefmann R., Rifkind J.M., Nagababu E., Bhattacharya J. // Blood. 2008. V. 111. P. 5205–5214.
135. Crawford J.H., Isbell T.S., Huang Z., Shiva S., Chacko B.K., Schechter A.N. et al. // Blood. 2006. V. 107. P. 566–574.
136. Abalenikhina Yu.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 611–625.
137. Yang J., Carrol K.S., Liebler D.C. // Molecular & Cellular Proteomics. 2016. V. 15. P. 1–11.
138. Finelli M.J. // Front Aging Neurosci. 2020. V. 12. e254. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00254>
139. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 5. P. 543–555.
140. Barbarino F., Wäschchenbach L., Cavalho-Lemos V., Dillenberger M., Becker K., Gohlke H., Cortese-Krott M.M. // Biol. Chem. 2020. V. 402. № 3. P. 317–331.
141. Diederich L., Suvorova T., Sansone R., Keller T.C.S. 4th, Barbarino F., Sutton T.R. et al. // Front. Physiol. 2018. V. 9. e332. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00332>
142. Desai K.M., Wu L. // Drug Metabol. Drug. Interact. 2008. V. 23. P. 151–173.
143. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. // Hemoglobin. 2013. V. 37. № 3. P. 205–218.
144. Svensson R., Alander J., Armstrong R.N., Morgenstern R. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 8869–8877.
145. Turell L., Botti H., Carballed S., Radi R., Alvarez B. // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2009. V. 877. № 28. P. 3384–3392.
146. Биллах Х.М., Хасанов Н.Р., Ослопов В.Н., Чугунова Д.Н. // Практическая медицина. 2013. Т. 3. № 71. С. 34–36.

Adaptation of Erythrocytes: The Role of Hemoglobin, Nitric Oxide and Methylglyoxal (Review)

O. V. Kosmachevskaya^a and A. F. Topunov^{a,*}

^aBach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

All living systems are characterized by such fundamental properties as the ability to adaptation, self-regulation and formation of resistance. Mammalian non-nuclear erythrocytes also have the ability to adapt to external effects, but their regulatory capabilities are limited by cytoplasmic mechanisms, including phase transitions of proteins and membranes. This is one of the most ancient mechanisms of adaptation of living systems to external and internal conditions. Erythrocytes under changes in plasma composition, aging and energy depletion, undergo a reversible morpho-functional transformation, the transition from a discocyte to an echinocyte. The metabolic shifts occurring in this case correspond to a complex of universal changes that take place during erythrocyte transition to metabolic depression. As a rule, echinocytosis is considered as a pathological process preceding eryptosis and hemolysis. But it can be also considered as the first stage of the implementation of an universal program of passive cell adaptation, the ultimate goal of which is to transfer the system to suspended animation state. The energy status of an erythrocyte is determined by the equilibrium of soluble and membrane-bound hemoglobin (Hb) forms. Compounds with pronounced electrophilic properties – nitric oxide and methylglyoxal, affecting this equilibrium can induce cell's transition from one metabolic state to another. The mechanism of their regulatory action is largely related to the modification of thiol groups of membrane and cytoskeleton proteins, including reactive SH-groups of Hb. It seems relevant to consider their effect on the state of Hb and erythrocytes.

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, membranes, thiols, adaptation, redox regulation, nitric oxide, methylglyoxal

УДК 577.115

МЕХАНИЗМЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (ОБЗОР)

© 2024 г. Е. С. Обухова^{1, *}, С. А. Мурзина^{2, **}

¹Петрозаводский государственный университет, Медицинский институт,
Петрозаводск, 185003 Россия

²Институт биологии – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра
“Карельский научный центр Российской академии наук”, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: Obyhova_elena@mail.ru

**e-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Среди многообразной биологической активности жирных кислот (ЖК) можно выделить способность оказывать бактерицидное действие на микроорганизмы или ингибировать их рост. Несмотря на то, что механизмы антибактериального действия ЖК изучены не до конца, наиболее распространенной их мишенью является клеточная мембрана, где ЖК вызывают повышение проницаемости и последующий лизис клетки, что приводит к нарушению цепи переноса электронов, разобщению окислительного фосфорилирования, угнетению ферментативной активности и потребления питательных веществ. Помимо действия на клеточные мембраны, ЖК обладают способностью нарушать процессы метаболизма микроорганизмов, ингибировать репликацию ДНК/РНК и влиять на экспрессию генов вирулентности. Кроме того, в настоящее время описывают нетрадиционные механизмы антимикробного действия ЖК, такие как ингибирование горизонтального переноса генов, чувства кворума и нарушение работы эффлюкс-помп. Многообразие противомикробных механизмов и широкий спектр активности ЖК определяют их высокий биотехнологический потенциал и делают актуальными дальнейшие исследования механизмов действия на биологические системы.

Ключевые слова: жирные кислоты, противомикробная активность, антибактериальные липиды

DOI: 10.31857/S0555109924060029 EDN: QGYDTS

Жирные кислоты (ЖК) находятся в организме в основном в связанном состоянии, реже в свободной или незатерифицированной форме, являются одними из самых лабильных компонентов липидов и характеризуются своей полифункциональностью [1]. Жирнокислотные компоненты липидов сравнительно быстро включаются в адаптивные реакции, а совокупность разнообразных ЖК обеспечивает организму как в обычных, так и в экстремальных условиях, возможность избирать альтернативные пути реагирования: регуляция жидкостности биомембран, изменение активности липопротеидных ферментов без изменения концентрации белка, синтез биологически активных веществ типа простагландинов, лейкотриенов и других, источником которых являются полиненасыщенные жирные кислоты и др.[2]. Следует отметить, что ЖК-компоненты составляют гидрофобные “хвосты” в структуре фосфолипидов (ФЛ), липидов биологической мембраны. При этом биологическая мембрана бактерий по качественному

и количественному составу ФЛ сильно отличается от таковой у эукариот, для которых характерны ФЛ или 1,2-диацилфосфоглицериды и именно ФЛ, в том числе их ЖК-компоненты, выполняют особую функциональную роль у бактерий. Например, морская бактерия *Nyphomonas jannaschiana* VP-2T содержит совершенно иные ФЛ – гликозилдиацилглицерины в форме нейтрального глюкозил-диацилглицерина (ДАГ), умеренно кислого глюкуронозил-диацилглицерина и сильно кислого таурина-мидглюкуронозил-диацилглицерина (25, 41 и 32% соответственно), а также ЖК как моно- и диэфиры глюкуроновой кислоты [3]. Однако другая морская аэробная гетеротрофная грамотрицательная бактерия *Cyclobacterium marinus* имеет повышенное содержание ФЛ и при этом на долю фосфатидилэтаноламина приходится 29%, а фосфатидилхолина – только 7%.

Жирные кислоты – это одноосновные карбоновые кислоты, углеводородная цепь с различным количеством атомов углерода, которая ограничена

с одного конца COOH карбоксильной группой атомов, а с другой CH_3 метильной группой. В составе липидов ЖК находятся в эстерифицированной форме (связанное состояние).

Жирные кислоты разделяют на три основных класса в зависимости от количества двойных связей в основной цепи атомов углерода. Выделяют насыщенные ЖК (**НЖК**), которые характеризуются отсутствием двойных связей в цепи, мононенасыщенные ЖК (**МНЖК**), имеющие одну двойную связь в *цис*-конфигурации и полиненасыщенные ЖК (**ПНЖК**), содержащие 2–6 двойных связей в *цис*-конфигурации [4], которые в природных ненасыщенных ЖК изолированы друг от друга или не сопряжены (то есть всегда отделены двумя простыми связями или одной метиленовой группой) (рис. 1).

Номенклатура ЖК основывается на количестве атомов углерода, составляющих углеводородную цепь, наличии и количестве двойных связей, и их положении в цепи. Так, общая формула ЖК может быть представлена следующим образом: $x:y(n-z)_{cis}$, где x — количество атомов углерода в цепи, y — количество двойных связей, $(n-z)$ — расположение двойной связи между атомами углерода, при их

нумерации с атома углерода карбоксильной группы. Формула завершается обозначением *цис*- или *транс*-конфигурации двойных связей.

Полиненасыщенные жирные кислоты во многом определяют внутреннюю структуру биологических мембран и условия работы интегральных белков [5]. Ряд экспериментальных данных [5, 6] свидетельствуют о том, что если липиды с полиненасыщенными цепями участвуют в образовании специфического микроокружения интегральных белков, то в силу своих физико-химических свойств они могут способствовать поддержанию надлежащей конформационной подвижности этих белков и ослаблять негативное воздействие факторов среды на их активность, тем самым, способствуя нормальному функционированию.

В 1940 гг. Бертеншоу предоставил одни из первых доказательств антимикробного действия липидов, установив, что липиды кожи человека убивают золотистый стафилококк [7]. В дальнейшем он предположил и подтвердил, что основной липидной фракцией, проявляющей антибактериальную активность, являются ЖК [8].

В настоящее время описано как бактериостатическое, так и бактерицидное действие ЖК в отношении различных групп микроорганизмов, имеющих значение в инфекционном процессе [9–11].

Установлено, что антибактериальные свойства ЖК проявляют себя в реакциях врожденного иммунитета человека и животных для защиты от патогенных микроорганизмов, в том числе в защите от бактерий со множественной лекарственной устойчивостью [9, 12, 13].

Антибактериальная активность ЖК определяет их высокий биотехнологический потенциал для создания противомикробных средств. При этом становится чрезвычайно важным изучение механизмов антимикробного действия ЖК, понимание которых составляет основу разработки новых антибактериальных соединений для лечения широкого спектра инфекционных заболеваний.

МЕХАНИЗМЫ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Механизмы антибактериального действия ЖК, связанные с активностью в отношении мембраны клетки. Литическое действие в отношении мембран бактериальных клеток является наиболее изученным и распространенным противомикробным механизмом действия ЖК [12, 14, 15]. Являясь амфипатическими, ЖК способны влиять на мембраны, приводя к их дестабилизации и последующему ингибированию роста или гибели микробной клетки. В основе этих процессов лежат повышение проницаемости мембраны клеток, нарушение цепи переноса электронов и разобщение окислительного

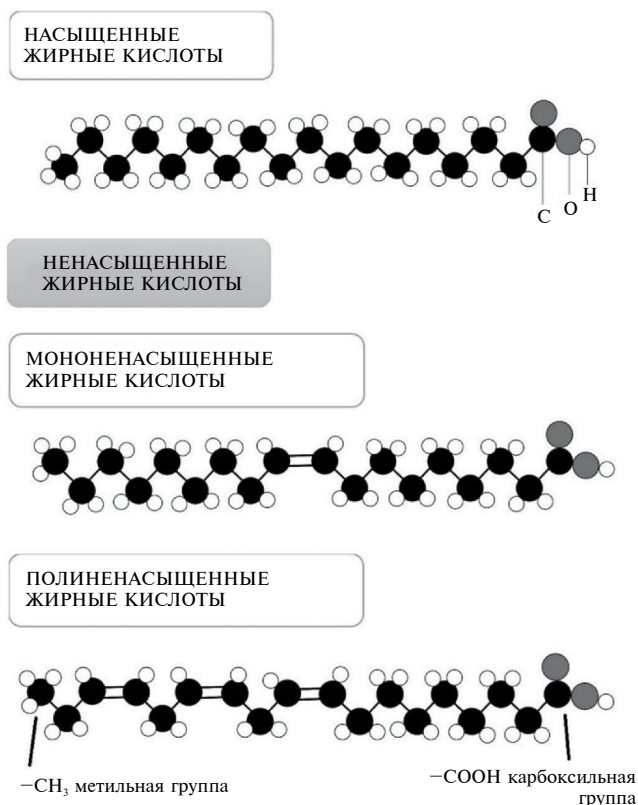


Рис. 1. Структурные формулы стеариновой кислоты, 18:0 — насыщенная жирная кислота, олеиновой кислоты, 18:1(n-9) — мононенасыщенная жирная кислота, α -линоленовой кислоты, 18:3(n-3) — полиненасыщенной жирной кислоты (n-3) семейства.

фосфорилирования, а также ингибирование мембранной ферментативной активности и нарушение потребления питательных веществ [10].

Повышение проницаемости мембраны и лизис клеток. Взаимодействие противомикробных липидов с мембранами бактериальных клеток может увеличить проницаемость мембраны, вызвать утечку цитозоля и, в конечном итоге, привести к лизису клеток микроорганизмов. В работе Карсона с соавт. [15] установлено, что такие ненасыщенные жирные кислоты, как олеиновая кислота 18:1(n-9) и линолевая кислота 18:2(n-6) способны увеличивать проницаемость мембраны и вызывать лизис бактериальных клеток *Streptococcus faecalis*. В исследованиях Томпсона с соавт. [17] с помощью электронной микроскопии выявлено, что обработка *Helicobacter pylori* линоленовой кислотой, 18:3(n-3), индуцирует лизис бактериальных клеток. Бергссон с соавт. обрабатывали *S. aureus* различными ЖК, включая каприновую кислоту 10:0, и продемонстрировали последующую дезинтеграцию бактериальной мембраны [18].

Основной предполагаемый механизм действия ЖК как противогрибковых агентов заключается в том, что они могут внедряться в липидные бислои грибковых мембран, нарушая их целостность и приводя к неконтролируемому высвобождению внутриклеточных электролитов и белков, что, в итоге, опосредует дезинтеграцию цитоплазматической мембраны грибковых клеток [19, 20].

Нарушение цепи переноса электронов и разобщение окислительного фосфорилирования. Цепь переноса электронов — это ключевой комплекс, состоящий из переносчиков электронов и источника энергии — аденозинтрифосфата (АТФ) и комплекса ферментов. Когда один из этапов цепи переноса электронов и окислительного фосфорилирования прерывается, бактериальным клеткам недостаточно энергии для функционирования, что приводит к ингибированию роста клеток и, в конечном итоге, к гибели клеток [12]. В исследовании Гринвэй с соавт. [21] наблюдали нарушение цепи транспорта электронов у *S. aureus* при обработке клеток линолевой кислотой.

Ингибирование мембранной ферментативной активности и потребления питательных веществ. Ингибирование активности мембранно-ассоциированных ферментов — важный механизм, с помощью которого антимикробные липиды влияют на мембраны бактериальных клеток. Исследования Вон с соавт. [22] показали, что ненасыщенные ЖК, такие, как олеиновая, линолевая и арахидоновая кислоты демонстрируют значительное ингибирование активности мембранно-ассоциированного фермента — глюкозилтрансферазы, что приводит к ингибированию роста бактериальных клеток [22].

Механизмы антибактериального действия жирных кислот, не связанные с активностью в отношении мембраны клетки. Помимо действия на мембраны,

ЖК обладают способностью нарушать процессы метаболизма микроорганизмов, ингибировать репликацию ДНК/РНК [23], влиять на экспрессию генов вирулентности [12], приводя к гибели бактериальные клетки.

Известно, что экзогенные ЖК и их смеси могут нарушать биосинтез ЖК бактериями. В исследованиях Женг с соавт. [11] установлено, что ненасыщенные кислоты, включая пальмитолеиновую кислоту, 16:1(n-9), олеиновую, линоленовую и арахидоновую кислоты, ингибируют бактериальную редуктазу белка-носителя еноилацила (FabI), необходимого для синтеза ЖК. Другие авторы показали, что пальмитолеиновая кислота является неподходящим субстратом для биосинтеза фосфолипидов у *S. aureus*, ЖК накапливалась в клетке и нарушала метаболизм микроорганизма [24].

Ингибирование биосинтеза ЖК у бактерий также может быть механизмом, ответственным за их противогрибковую активность. Например, было обнаружено, что 6-нонадециновая кислота препятствует биосинтезу сфинголипидов и подавляет рост штаммов *Candida albicans* [25].

Ингибирование репликации ДНК/РНК — является традиционным механизмом действия противомикробных химиотерапевтических средств [8]. В исследованиях Санабрия—Риос с соавт. [26, 27] пальмитоолеиновая кислота проявила ингибирующую активность в отношении ДНК-гиразы (фермента, контролирующего репликацию ДНК в клетках бактерий), тем самым действуя на полирезистентный штамм *S. aureus*.

Интересным свойством ЖК является их способность влиять на экспрессию бактериальных генов вирулентности. В работе Уитей с соавт. [28] было показано, что линолевая кислота и ее конъюгированная форма как *in vivo* так и *in vitro* способны ингибировать ген *Vibrio cholerae* ответственный за продукцию холерного токсина — основного фактора патогенности холерного вибриона, приводящего к секреторной диарее. Кроме того, Кенни с соавт. [7] определили, что линолевая кислота может изменять гены синтеза пептидогликана у *S. aureus* и тем самым опосредовать разрушение клеточной стенки бактерии [7].

Установлено, что экспрессия некоторых токсинов, гемолизин, ферментов, обуславливающих лекарственную устойчивость, а также феномен роения у *Proteus mirabilis* подавляются в присутствии различных насыщенных и ненасыщенных свободных ЖК (СЖК) [29, 30].

Есть предположение, что СЖК могут влиять на экспрессию бактериальных факторов вирулентности, путем нарушения передачи сигналов между клетками [12]. Таким образом, насыщенные и ненасыщенные СЖК могут предотвратить начальную бактериальную адгезию и последующие процессы биопленкообразования [31–33]. Следует отметить, что

помимо непосредственного губительного действия на микроорганизмы СЖК создают условия неблагоприятные для жизнедеятельности некоторых бактерий за счет поддержания кислого рН кожи и формирования тем самым барьерного гомеостаза [34].

НЕТРАДИЦИОННЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

В настоящее время выделяют нетрадиционные механизмы действия ЖК, сущность которых связана не с непосредственным лизисом микробных клеток, а с нарушением механизмов повышения вирулентности и антибиотикорезистентности бактерий. К таким механизмам относятся ингибирование горизонтального переноса генов (ГПГ), ингибирование чувства кворума (QS) и нарушение работы эффлюкс-помп, участвующих в формировании устойчивости к антибиотикам [23].

ГПГ является чрезвычайно быстрым механизмом приобретения антибиотикорезистентности, играющим ключевую роль в развитии и распространении устойчивости бактерий к антибиотикам [35].

В работе Касайлас–Варгас с соавт. [36] установлено, что 2-алкиновые ЖК являются ингибиторами конъюгации и активно нарушают перенос плазмид IncF, IncW и IncH (плазмиды резистентности и, контроля устойчивости к действию отдельных неблагоприятных факторов) у широкого круга патогенных бактерий, в том числе *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter* spp. В опытах *in vivo* (в пресной воде и кишечнике мыши) было установлено, что 2-гексадеценовая кислота способна блокировать конъюгацию у *E. coli* с эффективностью в 90% [37].

Чувство кворума (QS) — это молекулярный механизм, с помощью которого бактерии передают друг другу сигналы для коллективной адаптации в соответствии с плотностью клеток и окружающей средой [23]. Чувство кворума основано на системе молекулярных связей, позволяющих синхронизировать экспрессию определенных генов, регулирующих, помимо прочего, экспрессию факторов вирулентности и синтез биопленки [38].

В исследованиях на *Acinetobacter baumannii* показано, что МНЖК, такие, как пальмитолеиновая и миристолеиновая значительно снижают экспрессию гена *abaR* в системе *AbaIR QS*, ответственной за синтез биопленки [33].

При изучении действия линолевой, олеиновой, пальмитиновой и стеариновой кислот на аутоиндуктор-2 (AI-2) который играет ключевую роль в межклеточной коммуникации бактерий, установлено, что эти ЖК ингибируют AI-2 в диапазоне от 25 до 99% [39]. В исследовании Джин-Хуянг Лии с соавт. [40] установлено, что ЖК со средней длиной

цепи имитируют молекулу фарнезола QS, что приводит к снижению биопленкообразования и вирулентности *Candida albicans*.

В развитии устойчивости бактерий к антибиотикам важную роль играют эффлюкс системы или эффлюкс-помпы, локализованные в цитоплазматической мембране бактериальной клетки [41]. Эффлюкс системы — это белки-переносчики, способные к активному выведению широкого спектра различных по структуре антимикробных соединений [42] и опосредующие развитие лекарственной устойчивости, в том числе множественной [43].

В работе Дасаграндхи с соавт. [44] показано, что одним из механизмов действия фурановой ЖК является ингибирование эффлюкс-помпы *NorA* у *S. aureus* MRSA, активность которой обеспечивает золотистому стафилококку устойчивость к фторхинолонам, некоторым антисептикам и дезинфицирующим средствам [45].

В другом исследовании сообщается, что линолевая и олеиновая кислоты обладают синергической антибактериальной активностью в сочетании с эритромицином против MRSA и, возможно, действуют путем ингибирования эффлюкс-систем микроорганизма [46].

Обобщающая схема известных механизмов антибактериального действия ЖК приведена на рис. 2.

ОСОБЕННОСТИ АНТИМИКРОБНОГО СПЕКТРА ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Хорошо известно, что ЖК проявляют антимикробную активность в отношении широкого круга патогенов, при этом антибактериальная активность каждой кислоты определяется структурой и зависит от длины углеродной цепи, наличия, количества, положения и ориентации двойных связей [10, 12, 15]. Группа —ОН карбоксильной группы в ЖК также влияет на противомикробную активность, так, метилированные СЖК часто имеют пониженную активность или вообще не проявляют активности [11].

Среди насыщенных ЖК наиболее активные имеют 10 или 12 атомов углерода в цепи и антибактериальная эффективность имеет тенденцию к снижению по мере увеличения или уменьшения длины цепи [47, 48].

Значительной антибактериальной активностью обладает лауриновая кислота 12:0, в спектре антимикробного действия которой в основном грамположительные микроорганизмы. Установлено, что лауриновая кислота ингибирует рост *S. aureus* и *S. pneumoniae*, проявляя при этом меньшую активность в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli* и *Salmonella* spp. [49]. В другом исследовании показано, что лауриновая кислота обладает

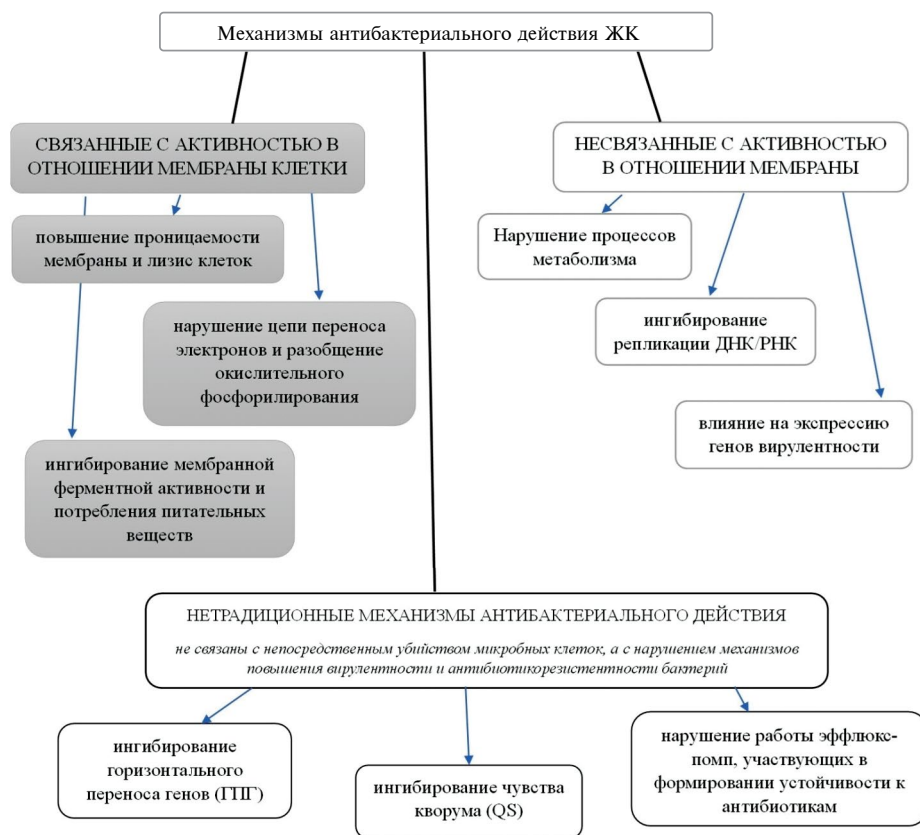


Рис. 2. Обобщающая схема известных механизмов антибактериального действия жирных кислот.

антибактериальным действием в отношении первую хотя бы полностью *S. agalactiae*, *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* и *S. aureus* и не проявляет активность в отношении грамотрицательных *E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens* [50].

В более раннем исследовании при систематическом изучении насыщенных ЖК с углеводородными цепями длиной от 6 до 18 атомов углерода было установлено, что лауриновая кислота, имеющая длинную цепь из 12 атомов углерода, также проявляет наиболее сильную активность в отношении ингибирования роста грамположительных бактерий, включая *S. aureus* [9].

В исследовании [51] показано, что лауриновая кислота проявляет антимикробную активность в концентрации 400 мкг/мл в отношении метициллин-чувствительных золотистых стафилококков (MSSA) и MRSA. В исследовании Ватанабе с соавт. [52] установлено, что каприловая, каприновая и лауриновая кислоты оказывали бактерицидное действие в отношении *S. aureus* и *S. epidermidis*.

Кроме того, лауриновая кислота продемонстрировала антимикробную активность в отношении изолятов *Clostridioides difficile* (грамположительного, анаэробного спорообразующего

патогена) за счет усиления выработки активных форм кислорода и последующего разрушения клеточной мембраны, а также за счет ингибирования процесса прорастания спор [53]. В другом исследовании на *C. difficile* было показано, лауриновая кислота оказывала наибольшее ингибирующее воздействие на рост исследуемого микроорганизма в то время как каприновая (10:0) и каприловая кислоты (8:0) подавляли рост, но в меньшей степени [54], что подтверждает предположение о влиянии структуры ЖК на антибактериальную активность.

В недавних исследованиях [40] по изучению противогрибкового действия ЖК было показано, что насыщенные кислоты со средней длиной цепи (C7:0, C8:0, C9:0, C10:0, C11:0) проявляют противомикробную активность в отношении *Candida albicans* при минимальной ингибирующей концентрации от 100 до 200 мкг/мл и ингибируют биопленкообразование на 75% при концентрации 2 мкг/мл. В литературе сообщается, что насыщенные ЖК проявляют ингибирующую активность как в отношении грамположительных, так и в отношении грамотрицательных бактерий [13, 11, 47].

Таблица 1. Активность некоторых жирных кислот в отношении распространенных патогенов человека

Жирная кислота	Активность		
	ГР (+)	ГР (–)	Другие микроорганизмы
Каприловая кислота 8:0		<i>E. coli</i> [56]	
Каприновая кислота 10:0	<i>S. aureus</i> [18], стрептококки группы А и группы В, <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> [9], <i>M. tuberculosis</i> [57]	<i>E. coli</i> [56]	<i>C. albicans</i> [20] <i>Candida</i> sp. [9]
Ундецеленовая кислота 11:0			<i>M. audouinii</i> , <i>Epidermophyton inguinale</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> и <i>Trichophyton mentagrophyte</i> [55]
Лауриновая кислота 12:0	<i>Clostridium difficile</i> [53], <i>S. aureus</i> [9, 15, 49, 52], <i>MPCA</i> [9, 51], <i>S. agalactiae</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> [50], стрептококки группы А и группы В [9, 18], <i>S. pneumonia</i> , <i>M. tuberculosis</i> [49]	<i>E. coli</i> [49, 56], <i>Salmonella</i> sp. [49] <i>H. pylori</i> [15]	<i>Candida</i> sp. [9, 58], <i>Candida albicans</i> [15]
Миристиновая кислота 14:0	Стрептококки группы А и группы В, <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> [9], <i>M. tuberculosis</i> [57]	<i>E. coli</i> [56]	<i>Candida</i> sp. [9]
Пальмитиновая кислота 16:0	<i>Enterococcus (Streptococcus) faecalis</i> [16], стрептококки группы А и группы В, <i>S. epidermidis</i> [9]	<i>E. coli</i> [56]	
Стеариновая кислота 18:0	<i>Enterococcus (Streptococcus) faecalis</i> [16]	<i>E. coli</i> [56]	
Пальмитолеиновая кислота 16:1(n-7)	Стрептококки группы А и группы В [18]	<i>A. baumannii</i> [33]	
Олеиновая кислота 18:1n-9	<i>Enterococcus (Streptococcus) faecalis</i> [16]		
Линолевая кислота 18:2n-6	<i>Enterococcus (Streptococcus) faecalis</i> [16], стрептококки группы А и группы В [9], <i>M. tuberculosis</i> [57, 59]		<i>Candida</i> sp.[9]
α-Линоленовая кислота 18:3n-3	<i>M. tuberculosis</i> [59]		
Эйкозопентаеновая кислота 20:5n-3	<i>Streptococcus mutans</i> [60], <i>S. epidermidis</i> и <i>S. aureus</i> [61]	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> [62]	<i>Trichomonas vaginalis</i> [64]
Докозагексоеновая кислота 22:6n-3	<i>Streptococcus mutans</i> [60], <i>S. epidermidis</i> и <i>S. aureus</i> [61]	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> [62], <i>H.pylori</i> [63, 65]	<i>C. albicans</i> [40]
Арахидоновая кислота 20:4n-6	<i>S. pneumonia</i> [66], <i>M.tuberculosis</i> [57]		<i>C. albicans</i> [40]

Есть предположение, что ненасыщенные ЖК обладают большей эффективностью как противомикробные агенты, чем насыщенные кислоты [12], при этом бактерицидная активность ненасыщенных ЖК увеличивается со степенью ненасыщенности [47] а также с длиной цепи [10, 11]. При изучении линолевой и олеиновой кислот обнаружено, что ненасыщенные ЖК в форме соли с *цис*-конфигурацией и увеличением числа двойных связей повышают антибактериальную активность при использовании отдельно или в сочетании с антибиотиками [46].

Многочисленные исследования подтверждают, что длинноцепочечные ненасыщенные ЖК обладают бактерицидным действием по отношению к важным патогенным микроорганизмам, включая устойчивый к метициллину золотистый стафилококк, *Helikobacter pylori* и микобактерии [11].

Установлено, что короткоцепочечные ЖК обладают выраженными фунгистатическими свойствами [15], ундециленовая кислота проявляет противогрибковую активность в отношении *Microsporum audouinii*, *Epidermophyton inguinale*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* и *Trichophyton mentagrophyte* [55].

В табл. 1 приведена противомикробная активность некоторых ЖК в отношении микроорганизмов, являющихся частыми возбудителями инфекций человека.

* * *

Таким образом, противомикробные свойства ЖК хорошо известны и представляют большой интерес для использования в качестве средств лечения и профилактики инфекционных заболеваний как альтернатива классическим антибактериальным препаратам или в комплексе с последними.

За последние несколько десятилетий достигнут значительный прогресс в понимании относительной эффективности и спектра антибактериальной активности различных классов противомикробных липидов, что, в свою очередь, позволило выявить наиболее перспективных кандидатов в лекарственные средства. Исследования ЖК были дополнены их подтвержденными традиционными антибактериальными механизмами, такими как нарушение цитоплазматической мембраны, ингибирование метаболических путей, ингибирование репликации ДНК/РНК и влияние на экспрессию бактериальных генов вирулентности. Более того, нетрадиционные механизмы, к которым относятся ингибирование горизонтального переноса генов, QS и нарушение работы эффлюкс-помп, учитываются как возможный механизм действия ЖК для снижения устойчивости бактерий к антибиотикам или уменьшения развития вирулентности бактерий.

В настоящий момент экспериментальные работы по изучению механизмов действия ЖК

дополняются исследованиями, направленными на определение корреляции свойств с физико-химическими параметрами, такими как длина цепи, наличие, количество, положение и ориентации двойных связей. При этом следует отметить, что исследования обычно включают модельные системы, которые не являются полностью аналогичными сложным бактериальным клеточным структурам, что затрудняет изучение механизмов действия ЖК. Кроме того, антибактериальные липиды могут обладать множественным действием на целевые группы микроорганизмов, что в ряде случаев может вызывать разногласия в представлении об основных направленностях антимикробного действия ЖК.

Исходя из представленного, требуется дальнейшее совершенствование исследований молекулярных основ взаимодействий противомикробных липидов с микроорганизмами *in vivo*, что, с учетом расширяющего спектра экспериментальных инструментов, позволит более глубоко изучить механизмы антимикробного действия ЖК и использовать противомикробные агенты на их основе в практической деятельности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Статья подготовлена в рамках государственного задания КарНЦ РАН FMEN-2022-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tocher D.R., Fonseca-Madrigal J., Bell J.G., Dick J.R., Henderson R.J., Sargent J.R.* // Fish Physiol. Biochem. 2002. V. 26. P. 157–170.
2. *Hochachka P.W., Somero G.N.* Bio-Chemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. N.Y.: Oxford University Press, 2002. 466 p.
3. *Батраков С.Г., Никитин Д.И., Ружицкий А.О., Оранская М.С.* // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. № 10. P. 768–777.
4. *Antonny B., Vanni S., Shindou H., Ferreira T.* // Trends in Cell Biology. 2015. V. 25. № 7. P. 427–436.
5. *Рабинович А.Л., Punammi П.О.* // Успехи современной биологии. 1994. Т. 114. Вып. 5. С. 581–594.
6. *Rabinovich A.L., Ripatti P.O., Balabaev N.K., Leermakers F.A.M.* // Phys.Rev. E 67. 2003. V. 67. № 1: e011909. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.67.011909>
7. *Kenny J.G., Ward D., Josefsson E., Jonsson I.M., Hinds J., Rees H.H., Lindsay J.A., Tarkowski A., Horsburgh M.J.* // PLoS One. 2009. V. . № 2. e4344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004344>

8. van Eijk E., Wittekoek B., Kuijper E.J., Smits W.K. // J. Antimicrob. Chemother. 2017. V.72. № 5. P. 1275–1284.
9. Kabara J., Swieczkowski D., Conley A., Truant J. // J. Antimicrob Agents Chemother. 1972. V. 2. № 1. P. 23–28.
10. Yoon B.K., Jackman J.A., Valle-González E.R., Cho N.J. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 4. e1114. <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>
11. Zheng C.J., Yoo J.S., Lee T.G., Cho H.Y., Kim Y.H., Kim W.G. // FEBS Lett. 2005. V. 579. № 23. P. 5157–5162.
12. Desbois A.P., Smith V.J. // Appl. Microbiol Biotechnol. 2010. V. 85. P. 1629–1642.
13. Desbois A.P. // Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 2012. V. 7. № 2. P. 111–122.
14. Jackman J.A., Yoon B.K., Li D., Cho N.J. // Molecules. 2016. V. 21. № 3. e305. <https://doi.org/10.3390/molecules21030305>
15. Fischer C.L. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 2. e75. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020075>
16. Carson D.D., Daneo-Moore L. // J. Bacteriol. 1980. V. 141. № 3. P. 1122–1126.
17. Thompson L., Cockayne A., Spiller R.C. // Gut. 1994. V. 35. № 11. P. 1557–1561.
18. Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrímsson O., Thormar H. // APMIS. 2001. V. 109. № 10. P. 670–678.
19. Avis T.J., Bélanger R.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 2. P. 956–60.
20. Guimarães A., Venâncio A. // Toxins. 2022. V. 14. № 3. e188. <https://doi.org/10.3390/toxins14030188>
21. Greenway D.L., Dyke K.G. // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 115. № 1. P. 233–245.
22. Won S.R., Hong M.J., Kim Y.M., Li C.Y., Kim J.W., Rhee H.I. // FEBS Lett. 2007. V. 581. № 25. P. 4999–5002.
23. Casillas-Vargas G., Ocasio-Malavé C., Medina S., Morales-Guzmán C., Del Valle R.G., Carballeira N.M., Sanabria-Ríos D.J. // Prog. Lipid Res. 2021. V. 82. e101093. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>
24. Parsons J.B., Yao J., Frank M.W., Jackson P., Rock C.O. // J. Bacteriol. 2012. V. 194. № 19. P. 5294–304.
25. Li X.C., Jacob M.R., ElSohly H.N., Nagle D.G., Smillie T.J., Walker L.A. et al. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. № 8. P. 1132–1135.
26. Sanabria-Ríos D.J., Morales-Guzmán C., Mooney J., Medina S., Pereles-De-León T., Rivera-Román A. et al. // Lipids. 2020. V. 55. № 2. P. 101–116.
27. Tomašič T., Katsamakos S., Hodnik Ž., Ilaš J., Brvar M., Solmajer T. et al. // J. Med. Chem. 2015. V. 58. № 14. P. 5501–5521.
28. Withey J.H., Nag D., Plecha S.C., Sinha R., Koley H. // Antimicrob. Agents Chemother. 2015. V. 59. № 12. P. 7471–7476.
29. Liaw S.J., Lai H.C., Wang W.B. // Infect Immun. 2004. V. 72. № 12. P. 6836–6845.
30. Clarke S.R., Mohamed R., Bian L., Routh A.F., Kokai-Kun J.F., Mond J.J. et al. // Cell Host Microbe. 2007. V. 1. № 3. P. 199–212.
31. Stenz L., François P., Fischer A., Huyghe A., Tangomo M., Hernandez D. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 287. № 2. P. 149–155.
32. Davies D.G., Marques C.N. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 5. P. 1393–1403.
33. Nicol M., Alexandre S., Luizet J.B., Skogman M., Jouenne T., Salcedo S.P., Dé E. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 1. e214. <https://doi.org/10.3390/ijms19010214>
34. Fluhr J.W., Kao J., Jain M., Ahn S.K., Feingold K.R., Elias P.M. // J. Invest. Dermatol. 2001. V. 117. № 1. P. 44–51.
35. Hiltunen T., Virta M., Laine A.L. // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological. 2017. V. 372. № 1712. P. 1–7.
36. Getino M., Sanabria-Ríos D.J., Fernández-López R., Campos-Gómez J., Sánchez-López J.M., Fernández A., Carballeira N.M., de la Cruz F. // mBio. 2015. V. 6. № 5. e01032–15. <https://doi.org/10.1128/mbio.01032-15>
37. Palencia-Gándara C., Getino M., Moyano G., Redondo S., Fernández-López R., González-Zorn B., de la Cruz F. // mBio. 2021. V. 12. № 4. e8406284. <https://doi.org/10.1128/mbio.01277-21>
38. Rémy B., Mion S., Plener L., Elias M., Chabrière E., Daudé D. // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. e203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>
39. Widmer K.W., Soni K.A., Hume M.E., Beier R.C., Jesudhasan P., Pillai S.D. // J. Food Sci. 2007. V. 72. № 9. P. M363–M368.
40. Lee J.H., Kim Y.G., Khadke S.K., Lee J. // Microb. Biotechnol. 2021. V. 14. № 4. P. 1353–1366.
41. Марданова А.М., Богомольная Л.М., Романова Ю.Д., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2014. № 1. С. 3. С. 54–59.
42. Blanco P., Hernando-Amado S., Reales-Calderon J.A., Corona F., Lira F., Alcalde-Rico M., Bernardini A., Sanchez M.B., Martinez J.L. // Microorganisms. 2016. V. 4. № 1. e14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>
43. Baharoglu Z., Mazel D. // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 55. № 5. P. 2438–2441.
44. Dasagrandhi C., Kim Y.S., Kim I.H., Hou C.T., Kim H.R. // Indian J. Microbiol. 2017. V. 57. № 4. P. 461–469.
45. Costa S.S., Sobkowiak B., Parreira R., Edgeworth J.D., Viveiros M., Clark T.G. et al. // Front. Genet. 2019. V. 9. e710. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00710>

46. Chan B.C., Han X.Q., Lui S.L., Wong C.W., Wang T.B., Cheung D.W. et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2015. V. 67. № 1. P. 107–116.
47. Sun C.Q., O'Connor C.J., Robertson A.M. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003. V. 36. № 1–2. P. 9–17.
48. Wille J.J., Kydonieus A. // *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2003. V. 16. № 3. P. 176–187.
49. Anzaku A.A., Akyala J.I., Juliet A., et al. // *Ann. Clin. Lab. Res.* 2017. 5: 2.
50. Nagase S., Matsue M., Mori Y., Honda-Ogawa M., Sugitani K., Sumitomo T. et al. // *J. Wellness Health Care.* 2017. V. 41. № 1. P. 87–95.
51. Kitahara T., Koyama N., Matsuda J., Aoyama Y., Hirakata Y., Kamihira S. et al. // *Biol. Pharm. Bull.* 2004. V. 27. № 9. P. 1321–1326.
52. Watanabe T., Yamamoto Y., Miura M., Konno H., Yano S., Nonomura Y. // *J. Oleo Sci.* 2019. V. 68. № 3. P. 291–296.
53. Yang H.T., Chen J.W., Rathod J., Jiang Y.Z., Tsai P.J., Hung Y.P. et al. // *Front Microbiol.* 2017. V. 8. e2635. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02635>
54. Shilling M., Matt L., Rubin E., Visitacion M.P., Haller N.A., Grey S.F., Woolverton C.J. // *J. Med. Food.* 2013. V. 16. № 12. P. 1079–1085.
55. Undecylenic acid. Monograph. *Altern. Med. Rev.* 2002. V. 7. № 1. P. 68–70.
56. Marounek M., Skřivanová E., Rada V. // *Folia Microbiologica.* 2003. V. 48. P. 731–735.
57. Dubos R.J. // *J. Exp. Med.* 1947. V. 85. № 1. P. 9–22.
58. Souza J.L., da Silva A.F., Carvalho P.H., Pacheco B.S., Pereira C.M., Lund R.G. // *Arch. Oral. Biol.* 2014. V. 5. № 9. P. 880–886.
59. Choi W.H. // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2016. V. 9. № 2. P. 125–129.
60. Sun M., Dong J., Xia Y., Shu R. // *Microb Pathog.* 2017. V. 107. P. 212–218.
61. Coraça-Huber D.C., Steixner S., Wurm A., Nogler M. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 4. e334. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040334>
62. Sun M., Zhou Z., Dong J., Zhang J., Xia Y., Shu R. // *Microb. Pathog.* 2016. V. 99. P. 196–203.
63. Correia M., Michel V., Matos A.A., Carvalho P., Oliveira M.J., Ferreira R.M., Dillies M.A., Huerre M., Seruca R., Figueiredo C., Machado J.C., Touati E. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. e35072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035072>
64. Korosh T., Jordan K.D., Wu J.S., Yarlett N., Upmacis R.K. // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2016. V. 63. № 2. P. 153–161.
65. Seabra C.L., Nunes C., Gomez-Lazaro M., Correia M., Machado J.C., Gonçalves I.C. et al. // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 519. № 1–2. P. 128–137.
66. Das U.N. // *J. Adv. Res.* 2018. V. 11. P. 57–66.

Mechanisms of the Antimicrobial Action of Fatty Acids (Review)

E. S. Obukhova^{a,*} and S. A. Murzina^{b,**}

^aPetrozavodsk State University, Petrozavodsk, 185003 Russia

^bInstitute of Biology of the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia

*e-mail: Obyhova_elena@mail.ru

**e-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Among the diverse biological activities of fatty acids, the ability to kill or inhibit the growth of microorganisms can be distinguished. Despite the fact that the antibacterial mechanisms of fatty acids are not fully understood, the most common target of action is the cell membrane, where FAs mediate an increase in permeability and subsequent cell lysis, lead to disruption of the electron transport chain, uncoupling of oxidative phosphorylation, and inhibit enzymatic activity and nutrient intake. In addition to acting on cell membranes, FAs have the ability to disrupt the metabolic processes of microorganisms, inhibit DNA/RNA replication, and affect the expression of virulence genes. In addition, non-traditional mechanisms of the antimicrobial action of FAs are currently being described, such as inhibition of horizontal gene transfer, quorum sensing, and disruption of the efflux pump. The variety of antimicrobial mechanisms and a wide range of their activity determine the high biotechnological potential of fatty acids and make further studies of the mechanisms of action on biological systems relevant.

Keywords: fatty acids, antimicrobial activity, antibacterial lipids

УДК 577.151+577.112

ВЛИЯНИЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ В СИСТЕМАХ С ГОМОПОЛИМЕРНЫМИ СУБСТРАТАМИ

© 2024 г. А. Б. Саченко¹, В. В. Щур¹, С. А. Усанов¹, А. В. Янцевич^{1, *}

¹Институт биоорганической химии Национальной Академии наук Беларуси,
Минск, 220141 Беларусь

*e-mail: yantsevich@iboch.by

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 05.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Проведено исследование влияния ДНК-связывающих белков EcSSB и Sso7d, стабилизирующих одноцепочечную и двуцепочечную ДНК соответственно, на активность терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) *in vitro*. В качестве субстрата использовали гомополимеры T_n, не склонные к образованию вторичных структур. Внесение в реакционную смесь EcSSB приводило к существенному повышению активности TdT и смещению спектра образующихся продуктов в сторону более протяженных олигонуклеотидов, а максимальный эффект наблюдался в близком к эквимолярному стехиометрическом соотношении (EcSSB)₄:TdT в присутствии катионов Mn²⁺. Присутствие Sso7d в реакционной смеси приводило к небольшому (до 15%) снижению активности TdT для субстратов T₅ и T₁₅ и более выраженному для T₃₅ (до 30%). При этом катионы Co²⁺ снижали ингибирующий эффект Sso7d. Продемонстрированное в данной работе влияние ДНК-связывающих белков на активность TdT, а также установленные закономерности, могут найти применение как в белковой инженерии при создании гибридных мультидоменных белков на основе TdT, так и при разработке новых принципов ферментативного *de novo* синтеза ДНК.

Ключевые слова: терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, ДНК-связывающий белок, EcSSB, Sso7d, *de novo* синтез ДНК

DOI: 10.31857/S0555109924060038 EDN: QGXEU1

В начале 21 века одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений биотехнологического рынка является синтез нуклеиновых кислот [1]. Начиная с работы Стеммера [2], опубликованной в 1995 г., и по сегодняшний день, основным исходным материалом для создаваемых *de novo* последовательностей ДНК являются олигонуклеотиды, получаемые методами твердофазного фосфорамидитного синтеза [1].

Именно твердофазный синтез является основной причиной ошибок в синтетических генах, а также источником токсичных отходов [3]. Негативное влияние на окружающую среду было минимизировано путем внедрения в практику технологий синтеза на микрочипах [4], что, однако, повысило вероятность возникновения ошибок.

Реализация программируемого ферментативного *de novo* синтеза ДНК в водных средах, на сегодняшний день, одна из самых актуальных задач синтетической биологии и во многом зависит от

успехов инженерии одной из уникальных ДНК-полимераз — терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (TdT) [5].

TdT является высокоспециализированной ДНК-полимеразой, которая относится к семейству X ДНК-полимераз и обеспечивает разнообразие антигенных рецепторов клеток иммунной системы позвоночных. Несмотря на то, что TdT была обнаружена одной из первых среди эукариотических ДНК-полимераз [6], детальный механизм функционирования этого фермента по-прежнему неясен.

TdT обладает способностью к неспецифическому хаотичному добавлению дезоксинуклеотидов к 3-концу ДНК, однако именно этот фермент открывает перспективы программируемого безматричного *de novo* ДНК-синтеза и новых “цифровых” ДНК-технологий. Более того, недавняя работа Верардо [8] описывает ферментативный мультиплексный автоматизированный синтез ДНК с участием TdT.

Активность TdT связана с клетками иммунной системы, а биологическая функция заключается в реализации механизма V(D)J-рекомбинации ДНК, происходящей на ранних этапах дифференцировки лимфоцитов и приводящей к формированию антиген-распознающих участков антител и Т-клеточного рецептора.

Субстратом TdT является одноцепочечная ДНК (оцДНК), содержащая не менее трех остатков фосфорной кислоты: 5'-фосфорилированный тринуклеотид или нефосфорилированный тетрануклеотид [9].

Несмотря на интенсивные исследования в течение 60 лет с момента открытия, TdT является ферментом с недостаточно изученным для белковой инженерии механизмом действия. Открытые вопросы по-прежнему связаны с переключением между процессивным и дистрибутивным механизмом, влиянием катионов двухвалентных металлов [10]. Последние исследования кинетики реакций с участием TdT [10] указывают на то, что механизм действия фермента не может быть описан строго по классической схеме, характерной для большинства ДНК-полимераз [11].

Известно, что существуют факторы, препятствующие эффективной работе фермента TdT, которые связаны с формированием в молекуле оцДНК вторичных структур. Так, образование шпильчатых структур на 3'-конце субстрата существенно ингибирует реакцию [12].

Подходы, основанные на создании гибридных мультидоменных белков, уже продемонстрировали свою эффективность в белковой инженерии. Общая стратегия по созданию гибридных ДНК-полимераз путем объединения генов термостабильных ДНК-полимераз и гена белка, связывающего двуцепочечную ДНК, представлена в работе [13]. Гибридные термостабильные ДНК-полимеразы на основе Pfu-полимеразы и фрагмента ДНК-связывающего белка *Sulfolobus solfataricus* [4] стали основой коммерческих высокоточных и эффективных ДНК-полимераз Q5 ("New England Biolabs", Великобритания) и Fusion ("Thermo Fisher Scientific", США). Внедрение гибридных полимераз в практику синтеза генов существенно улучшило результаты сборки генов из олигонуклеотидов за счет уменьшения вероятности возникновения ошибок и отсутствия 3'–5'- и 5'–3'-экзонуклеазной активности, что позволило синтезировать более протяженные гены (до 2000 пар нуклеотидов) с использованием новых подходов [14].

ДНК-связывающий белок Sso7d *S. solfataricus* имеет молекулярную массу 7 кДа, обладает компактной глобулярной структурой и существует в виде мономера [15]. Sso7d неспецифически к последовательности связывается с двуцепочечной ДНК (дцДНК) любого размера и состава нуклеотидов [16]. У гипертермофильных архей, Sso7d выполняет функцию стабилизации ДНК, предохраняя ее от

действия высоких температур [17]. Взаимодействие белка с ДНК происходит за счет частичной интеркаляции гидрофобных боковых групп Val²⁶ и Met²⁹, что приводит к резкому изгибу двойной спирали ДНК и увеличивает температуру плавления ДНК [18]. После использования в качестве домена-модуля при дизайне высокоэффективных термостабильных ДНК-полимераз Sso7d стал популярен при дизайне мультидоменных гибридных белков.

Белок, связывающий одноцепочечную ДНК из *E. coli* (EcSSB), представляет собой гомотетрамер, состоящий из четырех идентичных полипептидных цепей с молекулярной массой около 18.9 кДа. EcSSB специфично связывается с одноцепочечной ДНК, при этом связывание является кооперативным и определяется параметрами среды, главным образом ионной силой. Основная функция EcSSB – дестабилизация двойной спирали ДНК для обеспечения работы ДНК-полимераз в процессе репликации. При этом белок является достаточно стабильным, сохраняя функциональные свойства после 20-минутной инкубации при температуре 65°C.

Уникальные свойства EcSSB обеспечили возможность его использования в молекулярной биологии для предотвращения образования димеров и шпильчатых структур в олигонуклеотидах при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР). Прочность связывания EcSSB с оцДНК очень высока ($K_a = 10^7$ – 10^8 М⁻¹ с⁻¹) [19]. Благодаря этому свойству EcSSB применяется для обнаружения повреждений в ДНК [20], дестабилизации двойной спирали [20] и активации взаимодействующих с ДНК белков (RecF, RecQ и ДНК-хеликазы), участвующих в рекомбинационной репарации ДНК [21]. Присутствие в реакционной смеси EcSSB увеличивает выход ПЦР для матриц, содержащих вторичную структуру и/или склонных к мутагенезу с делециями ДНК [22]. Использование EcSSB делает возможным анализ более длинных нуклеотидных последовательностей при пиросеквенировании [23].

Целью данной работы является исследование влияния ДНК-связывающих белков микроорганизмов, специфичных как к оцДНК (SSB-белок *E. coli*), так и к дцДНК (Sso7d-белок *S. solfataricus*) на ферментативную активность TdT и перспектив использования ДНК-связывающих белков в ферментативном *de novo* синтезе ДНК, а также анализ возможности создания гибридных мультидоменных ферментов путем слияния генов TdT и ДНК-связывающих белков.

МЕТОДИКА

Реагенты. В работе использованы компоненты питательных сред ("Conda", Испания), ИПТГ, имидазол, PMSF ("Glenthams Life Sciences", Великобритания), акриламид, бисакриламид, агароза ("Serva", Германия), глицин, додецилсульфат

натрия (“Merck”, Германия), сорбент – Ni^{2+} NTA-агароза, набор для выделения ДНК (“Macherey–Nagel”, Германия). Остальные использованные реагенты – коммерческие препараты фирмы “Sigma–Aldrich” (США). Для проведения работ с синтетической и рекомбинантной ДНК использовали эндонуклеазы рестрикции и ДНК-полимеразы фирмы “New England Biolabs”, (США), набор для клонирования pJET1.2 – фирмы “Thermo Fisher Scientific” (США). Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) олигонуклеотидов, масс-спектрометрии белков и пептидов использовали растворители и реагенты соответствующего качества.

Оборудование. Одноцепочечные фрагменты ДНК синтезировали на автоматическом синтезаторе H32 (“K&A”, Германия). Для гомогенизации бактериальных клеток использовали гомогенизатор Emulsiflex C5 (“Avestine”, Канада). Вертикальный электрофорез белков и нуклеиновых кислот проводили на оборудовании Hoefer SE250 (“Hoefer”, США). Для очистки белков использовали хроматограф Biologic LP-LC (“BioRad”, США). Для регистрации масс-спектров белков использовали масс-спектрометр MALDI-TOF MicroFlex (“Bruker”, Германия). Для подтверждения аминокислотной последовательности белков использовали хромато-масс-спектрометр Agilent 1290 Q-TOF 6550 (“Agilent”, США). Электронные спектры поглощения олигонуклеотидов и белков записывали

на микроспектрофотометре DS-11 FX+ (“DeNovix”, США). Для секвенирования использовали анализатор генов 3500xL (“Applied Biosystems”, США).

Создание экспрессионных векторов. Олигонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом как описано в [24]. Ген EcSSB клонировали из геномной ДНК *E. coli* штамма DH5 α . Оптимизированные для экспрессии в клетках *E. coli* гены TdT *Bos taurus* и Sso7d *Sulfolobus solfataricus* синтезировали *de novo* из 65-звенных олигонуклеотидов используя полимеразную цепную сборку. Полученную последовательность EcSSB клонировали в вектор pET20b по сайтам рестрикции NdeI и HindIII. Гены Sso7d и TdT клонировали в вектор pCWork по сайтам рестрикции NdeI и HindIII. Идентичность полученных последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Аминокислотные последовательности кодируемых белков представлены в табл. 1.

Экспрессия рекомбинантных белков. Для экспрессии рекомбинантных белков использовали рекомбинантные штаммы *E. coli*, трансформированные соответствующими экспрессионными векторами.

После достижения культурой оптической плотности $A_{600\text{nm}} = 0.6$ и снижения температуры культивирования до 18°C синтез белка индуцировали добавлением в среду ИПТГ до концентрации 1 mM. Экспрессию белка продолжали в течение 24 ч, клетки осаждали центрифугированием (3000 g,

Таблица 1. Аминокислотные последовательности и свойства белков

EcSSB 191 аминокислотный остаток 20.49 кДа pI = 6.12 $\epsilon_{280} = 27\,700\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$	MASRGVNKVLVGNLQDPEVRYMPNGGAVANITLATSESWRDKAT GEMKEQTEWHRVVLFGKLAEVASEYLRKGSQVYIEGQLRTRKWTDQ SGQDRYTTEVVVNVGGMQMLGGRQGGGAPAGGNIGGGQPQGGWGQ PQQPQGGNQFSGGAQSRPQQSAPAAPSNEPPMDFDDDDIPFKLAAAL EHHHHHH
Sso7d 79 аминокислотных остатков 9.03 кДа pI = 8.99 $\epsilon_{280} = 8\,480\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$	MLGGHMRGSHHHHHHMA TVKFKYKGEEKEVDISKIKKVVRVGMIS FTYDEGGGKTGRGAVSEKDAPKELLQMLEKQKK
TdT 530 аминокислотных остатков 60.92 кДа pI = 7.84 $\epsilon_{280} = 65\,890\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$	MRGSHHHHHHMAQQRQHQRLPMDPLCTASSGPRKKRPRQVGASMAS PPHDIKFQNLVLFLEKKMGTTTRRNFLMELARRKGFRVENELSDSV THIVAENNSGSEVLEWLQVQNI RASSQLELLDVSWLIESMGAGKPV EITGKHQDLVVRTDYSATPNPGFQKTPPLAVKKISQYACQRKTTLNN YNHIFTDAFEILAENSEFEKENEVS YVTFMRAASVLKSLPFTIISMK DTEGIPCLGDKVKCIIEEIIEDGESSEVKAVLNDERYQSFKLFTSV FGVGLKTSEKWFRMGFRSLSKIMSDKTLKFTKMQKAGFLYYEDLV CVTRAEAEAVGVLVKEAVWAFLPDAFVTMTGGFRRGKKIGHD VDFL ITSPGSAEDEEQLLPKVINLWEKKGLLLYYDLVESTFEKFKLPSRQ VDTLDHFQKCFILKLHHQRVDSSKSNQQEGKTWKAIRVDLVMCPY ENRAFALLGWTGSRQFERDIRRYATHERKMMLDNHALYDKTKRVFL KAEEEEIFAHGLDYIEPWERNA

4°C). Клеточную массу ресуспендировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 0.3 М NaCl, 10 мМ имидазол, 0.1 мМ PMSF, 20%-ный глицерин.

Гомогенизация клеток *E. coli*. Суспензию клеток, содержащих рекомбинантный белок, пропускали через гомогенизатор Emulsiflex C5. Полученный гомогенизат центрифугировали в течение 50 мин при 4°C в центрифужном поле 40 000 g. Полученную прозрачную жидкость над осадком использовали для выделения целевых белков.

Метало-хелатная хроматография. Для метало-хелатной хроматографии использовали буферные растворы L1 (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.3 М NaCl, 10 мМ имидазол); W1 (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.3 М NaCl, 50 мМ имидазол); E1 (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8.0, 0.3 М NaCl, 250 мМ имидазол). Жидкость над осадком, содержащую белок, наносили на хроматографическую колонку с 10 мл сорбента Ni²⁺-NTA, промывали 10 объемами буфера L1, 20 объемами буфера W1 и элюировали буфером E1, собирая фракции объемом 0.5 мл.

Фракции, содержащие белок с электрофоретической чистотой более 95% и концентрацией более 1 мг/мл, объединяли и с помощью диализа переводили в буфер для хранения. Белок Sso7d был выделен ранее по методике описанной в [10].

Для хранения TdT использовали буфер S1 (50 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7.3, 300 мМ NaCl, 1.43 мМ β-меркаптоэтанол, 50%-ный глицерин, 0.1%-ный Тритон X-100), для хранения белков Sso7d и EcSSB буфер S2 (50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 0.2 М NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, 50% глицерин, 1.0 мМ дитиотреитол, ДТТ).

Пробоподготовка для анализа белков. Для масс-спектрометрии белков образцы (100 мкг белка) обессоливали путем осаждения 70%-ным этанолом, осадок растворяли в 20 мкл 70%-ного водного раствора муравьиной кислоты. Полученный раствор смешивали с раствором матрицы НССА (α-циано-4-гидроксикоричная кислота) или синапиновой кислоты в соотношении 1 : 1 и наносили на металлическую пластину для масс-спектрометрии ("Bruker", Германия).

Для подтверждения последовательности белка методами пептидного "фингерпринта" и тандемной масс-спектрометрии, осадок белка после обессоливания восстанавливали ДТТ, модифицировали йодацетамидом и проводили трипсинолиз в 100 мМ аммоний-бикарбонатном буфере [25].

Анализ каталитической активности TdT. Фермент (1 мкл, 4 мкМ) вносили в 100 мкл реакционной смеси, следующего состава: 0.2 мМ тимидинтрифосфат, ТТР, 5 мМ АсОК, 2 мМ АсОТрис, pH 7.9, 1 мМ АсОМg, содержащей 40 пмоль олигонуклеотида (конечная концентрация 0.4 мкМ) и

выдерживали при 37°C в течение 30 мин. Фермент инактивировали нагреванием при 70°C в течение 10 мин. К раствору добавляли 100 мкл 100 мМ буфера триэтиламинацетата (ТЕААс), pH 7.0, и центрифугировали при 19 000 g, 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в хроматографические вials со вставками объемом 150 мкл. Исследования влияния белков EcSSB и Sso7d на ферментативную активность TdT проводились в идентичных условиях.

При исследовании влияния катионов металлов на активность TdT в реакционную смесь дополнительно вводили 0.25 мМ Me²⁺. Эксперименты по определению активности TdT и по изучению действия белков проводились в трех повторностях.

Количественное определение активности фермента основано на возможности разделять олигонуклеотиды различной длины с помощью ион-парной обращенно-фазовой хроматографии. Удлинение олигонуклеотида приводит к соответствующему увеличению коэффициента молярной экстинкции, что позволяет точно рассчитать количество включенных в полимер остатков тимидина.

Реакционную смесь фракционировали на колонке Thermo Fisher Scientific Hypersil GOLD (2.1 × 50 мм, 1.9 мкм). Подвижная фаза А — 100 мМ буфер ТЕААс, pH 7.0, в 5%-ном ацетонитриле. Подвижная фаза Б — 100 мМ буфер ТЕААс, pH 7.0, в 20%-ном ацетонитриле.

Объем вводимой пробы — 5 мкл. Для формирования градиента использовали бинарный насос и следующий режим элюирования: 35% фазы Б к объему элюэнта в течение 2 мин, от 35 до 65% — 19 мин и 65% в течение 9 мин. Скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин, температура колонки 40°C. Субстрат и продукты реакции детектировали при длине волны 260 нм. Анализ хроматограмм проводили в программе MassHunter V 11.0 ("Agilent", США). В описанных условиях время удерживания (t_R) олигонуклеотидов составляло: T₅ 5.6 мин; T₁₅ 12.4 мин; T₂₅ 15.2 мин; T₃₀ 16.5 мин; T₄₅ 18.1 мин; T₅₀ 22.2 мин.

Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$U = \frac{S_f - S_{std}}{S_{std} \cdot T} L,$$

где: U — активность фермента; S_f — площадь хроматографического пика, соответствующего продукту ферментативной реакции TdT; S_{std} — площадь хроматографического пика, соответствующего исходному субстрату до реакции с TdT; L — длина последовательности олигонуклеотидного субстрата; T — время проведения ферментативной реакции, ч.

Одна единица активности TdT соответствовала количеству фермента, которое необходимо для включения 1 нмоль остатка тимидина в олигонуклеотид за 60 мин при 37°C.

Анализ ДНК-связывающей способности EcSSB.

На центрифужную колонку объемом 250 мкл с 50 мкл сорбента Ni^{2+} -NTA наносили 2 мг EcSSB и центрифугировали при 3100 g 3 мин. Колонку промывали буфером В, содержащем 10 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 200 мМ NaCl, 10 мМ MgCl_2 . Затем наносили 100 мкл 5 мкМ раствора 15-звенного олигонуклеотида. Колонку промывали буфером В. Элюаты собирали в новую пробирку объемом 1.5 мл и записывали спектр поглощения раствора. По разнице оптической плотности при 260 нм исходного раствора олигонуклеотида, нанесенного на колонку, и элюатов, определяли количество связавшейся ДНК.

Анализ ДНК-связывающей способности Sso7d.

Функциональную активность Sso7d подтверждали путем оценки изменения электрофоретической подвижности плазмидной ДНК в присутствии Sso7d. Sso7d смешивали с плазмидной ДНК (электрофоретическая подвижность суперспирализованной формы соответствует 5000-звенной линейной дцДНК) в эквимольном соотношении и перемешивали. После добавления буфера для нанесения, содержащего: 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 60 мМ ЭДТА, 60%-ный глицерин, 0.48%-ный додецилсульфат натрия и 0.03%-ный бромфеноловый синий, проводили электрофорез в 1%-ном агарозном геле. Все измерения проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование, экспрессия и очистка белков TdT, EcSSB, Sso7d. Идентичность последовательностей генов рекомбинантных белков, клонированных в экспрессионные вектора, подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

Электрофоретически гомогенные препараты EcSSB и TdT были успешно получены с использованием стандартного метода металло-хелатной хроматографии. Однако металло-хелатная хроматография не позволила очистить белок Sso7d, поскольку в описанных условиях белок не связывался с сорбентом Ni^{2+} -NTA. Для его очистки использовали термическую обработку надосадочной жидкости с последующим центрифугированием, ультрафильтрацией на мембранах с порогом отсека 10 кДа и катионообменной хроматографией [10].

Выход рекомбинантных белков составил 130 мг на 1 л культуральной среды для EcSSB, 70 мг для Sso7d, 5 мг для TdT. Электрофоретическая гомогенность всех полученных препаратов белка составляла более 95%.

Идентичность последовательностей целевых белков подтверждена методами электрофореза в ПААГ (рис. 1) в денатурирующих условиях, масс-спектрометрией MALDI-TOF и тандемной масс-спектрометрией.

Функциональная активность Sso7d подтверждена изменением электрофоретической подвижности плазмидной ДНК в присутствии белка (рис. 2а).

Методом аффинной хроматографии на центрифужных колонках, доказано, что белок EcSSB взаимодействует с оцДНК, включая 4 возможных типа гомополимерных олигонуклеотидов. При этом в эксперименте эффективность связывания EcSSB различалась для гомополимерных олигонуклеотидов (рис. 2б) [26], убывая в ряду $dC_n > dG_n > T_n > dA_n$, являясь более прочной для полицитидиновых гомополимеров.

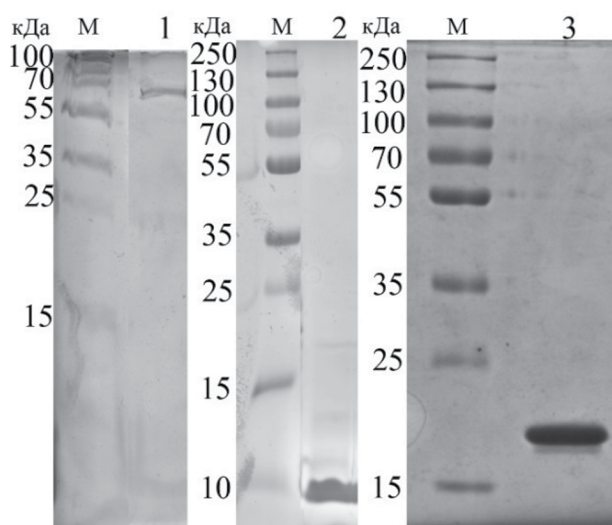


Рис. 1. Результаты ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях образцов выделенных рекомбинантных белков TdT (дорожка 1), Sso7d (дорожка 2) и EcSSB (дорожка 3); М – стандарт молекулярных масс белков 10–250 кДа.

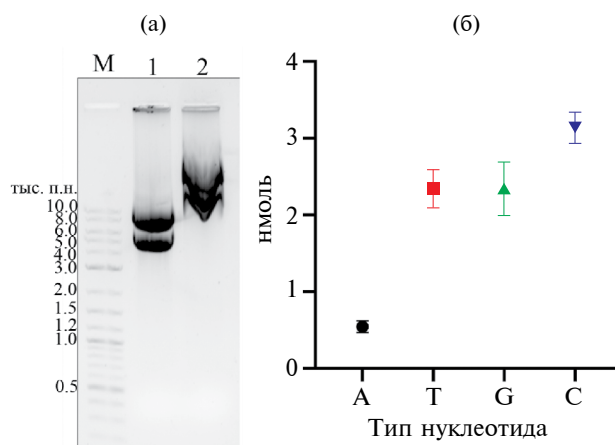


Рис. 2. Результаты электрофореза кольцевой плазмидной ДНК (5994 п.о.) в 1% агарозном геле без Sso7d (дорожка 1), в присутствии Sso7d (дорожка 2). М – стандарт линейной ДНК (а); количество гомополимерных 15-мерных олигонуклеотидов различной природы (нмоль), связавшихся с EcSSB (10 нмоль), иммобилизованным на Ni^{2+} -NTA-агарозе (б).

Зависимость активности TdT от длины субстрата. TdT взаимодействует с оцДНК или одноцепочечной РНК, которые содержат не менее четырех остатков фосфорной кислоты. Следовательно, в качестве минимального субстрата могут выступать либо фосфорилированные по 5'-концу тринуклеотиды, либо тетрануклеотиды. При увеличении длины субстрата неизбежно образуются вторичные структуры, что может существенно снижать скорость присоединения нуклеотидов.

По этой причине для оценки влияния ДНК-связывающих белков на реакции с участием TdT в качестве субстрата в данной работе использовали гомополимеры T_n ($n = 5-50$), не склонные к образованию вторичных структур, что создает оптимальные условия для работы фермента. Процесс элонгации цепи происходит по классическому механизму предложенному Стейцем с соавт [11] с некоторыми изменениями. Для взаимодействия с субстратом необходимы два катиона Mg^{2+} , расположенные в сайтах А и В. Ионы металлов связываются с ДНК-полимеразой через карбоксильные группы консервативных остатков аспартата или глутамата в palm-домене фермента. Катион А активирует 3'-ОН группу субстрата, что приводит к нуклеофильной атаке α -фосфатной группы. Оба катиона стабилизируют переходное состояние. Катион В стабилизирует уходящую пиррофосфатную группу и способствует освобождению продукта реакции.

Условия реакции (время, концентрация фермента, олигонуклеотида и ТТР) и хроматографии (время и градиент) подбирали с учетом методики анализа, для оптимального разделения разных по длине исходных олигонуклеотидов. Исследование олигонуклеотидных субстратов T_5-T_{45} продемонстрировало, что активность TdT растет с увеличением протяженности олигонуклеотида (рис. 3). При длине субстрата в 45 и 50 нуклеотидов скорость уже не меняется. Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее для серии гомополимерных олигонуклеотидов dA_n ($n = 4-50$) [9].

В качестве модельного субстрата в данном исследовании выбрали T_{15} так как его элонгация ферментом TdT эффективно детектируется стандартными методами ион-парной обращенно-фазовой хроматографии, при этом его длина существенно больше минимальной длины субстрата, содержащего четыре фосфатные группы. Дальнейшее увеличение протяженности исходного олигонуклеотида приводит к наложению пиков продуктов реакции, что не позволяет корректно определить их распределение (рис. 4).

Влияние катионов двухвалентных металлов на активность TdT. Влияние катионов двухвалентных металлов на активность TdT и других ДНК-полимераз по-прежнему остается предметом обсуждения и исследования во многих работах [27]. Как и большинство полимераз, TdT в активном центре

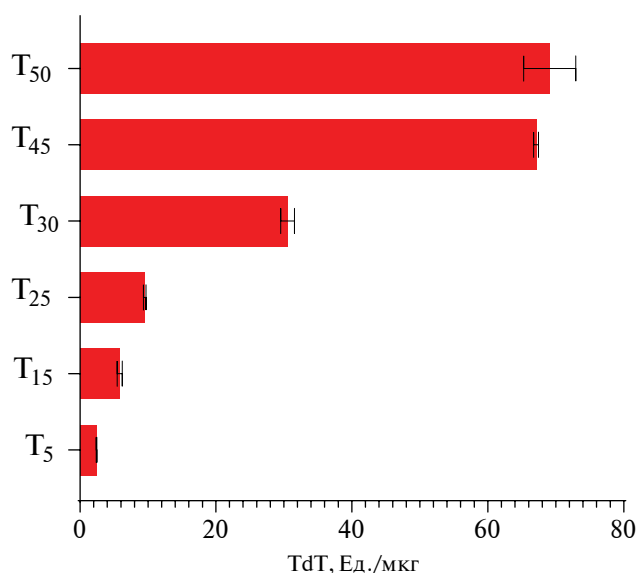


Рис. 3. Зависимость активности TdT от длины олигонуклеотидного субстрата в серии гомополимеров T_n .

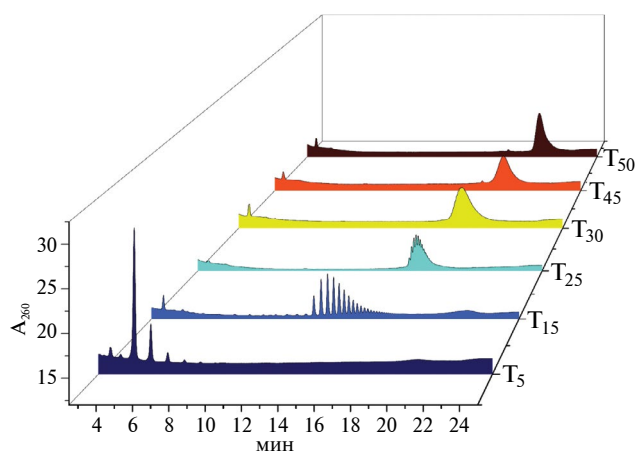


Рис. 4. Хроматограммы продуктов элонгации субстратов различной длины (T_5-T_{50}) с участием TdT (конц. ТТР 200 мкМ, время реакции 30 мин): время удерживания, соответствующее субстратам: T_5 — 5.6 мин; T_{15} — 12.4 мин; T_{25} — 15.2; T_{30} — 16.5 мин; T_{45} — 18.1 мин; T_{50} — 22.2 мин.

содержит катионы, которые необходимы для работы фермента и определяют координационную геометрию активного центра [28]. В случае TdT предпочтение катионов Me^{2+} не настолько строгое, как для репликационных ДНК-полимераз, а эффект зависит от природы субстрата и нуклеотидов. Например, для субстратов dA_{5-50} активность фермента уменьшается в ряду $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Mn^{2+}$ при элонгации олигонуклеотидов с участием dATP [9]. Присутствие Mg^{2+} обеспечивает максимальный эффект при добавлении остатков dG. Ионы Co^{2+} способствуют полимеризации пиримидиновых нуклеотидов, а Mn^{2+} — пуриновых [29]. Известно, что TdT не обладает высоким сродством к

катионам металлов. Таким образом, соотношение концентраций Me^{2+} в реакционной среде определяет состояние активного центра фермента, а следовательно, и механизм ферментативной реакции.

Механизм полимеризации с участием TdT может реализовываться как с диссоциацией образованного олигонуклеотида (дистрибутивный механизм), так и с его перемещением в активном центре (процессивный механизм) без распада белково-нуклеинового комплекса.

Для определения влияния катионов Me^{2+} на ферментативную активность TdT в реакционную смесь, содержащую 1.0 мМ Mg^{2+} , дополнительно добавляли 0.25 мМ Me^{2+} (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) в виде хлоридов. Наибольший эффект на активность TdT проявили катионы Co^{2+} и Mn^{2+} , что не противоречит данным литературы (рис. 5) [30, 31]. Повышение концентрации Mg^{2+} увеличивало активность TdT на 35% (рис. 5). Незначительное увеличение активности фермента наблюдалось в присутствии катионов Zn^{2+} , а добавление Ca^{2+} в пределах ошибки эксперимента не влияло на функционирование фермента.

Количественная оценка распределения продуктов элонгации T_{15} показала, что в присутствии катионов Mn^{2+} в продуктах реакции появляются T_{37-39} , при этом по сравнению с альтернативными условиями наблюдалось смещение в сторону более протяженных T_{22-36} продуктов (табл. Д1). Представление распределения продуктов реакции по длине в виде зависимости суммарной площади хроматографических пиков субстратов (S) от количества добавленных оснований ($\sum_{i=1}^N S_n \sum S_n$ от n , где S_n — это площадь хроматографического пика, соответствующая продукту с длиной $l + n$, где l — длина исходного субстрата, n — количество присоединенных нуклеотидов, N — максимальное количество присоединенных нуклеотидов), позволяет четко дифференцировать различия в характере реакций с короткими и длинными субстратами, а также влияние катионов металлов (рис. 6а).

Из графика, представленного на рис. 6а, заметно, что разница между влиянием Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} не существенна, Zn^{2+} снижал процессивность фермента, а Mn^{2+} существенно повышал ее.

Влияние EcSSB на ферментативную активность TdT. Свойства EcSSB связывать и стабилизировать оцДНК с одной стороны может оказать ингибирующее действие путем конкурентного связывания, а с другой может быть перспективным для повышения активности TdT. Для проверки этих гипотез все последующие эксперименты проводили в одинаковых условиях с использованием одной партии TdT, как описано в материалах и методах.

Результаты анализа влияния EcSSB на ферментативную активность TdT, продемонстрировали концентрационную зависимость, характер которой

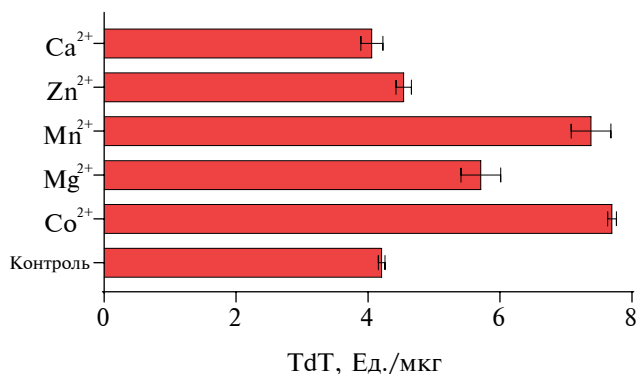


Рис. 5. Влияние катионов Me^{2+} на ферментативную активность TdT.

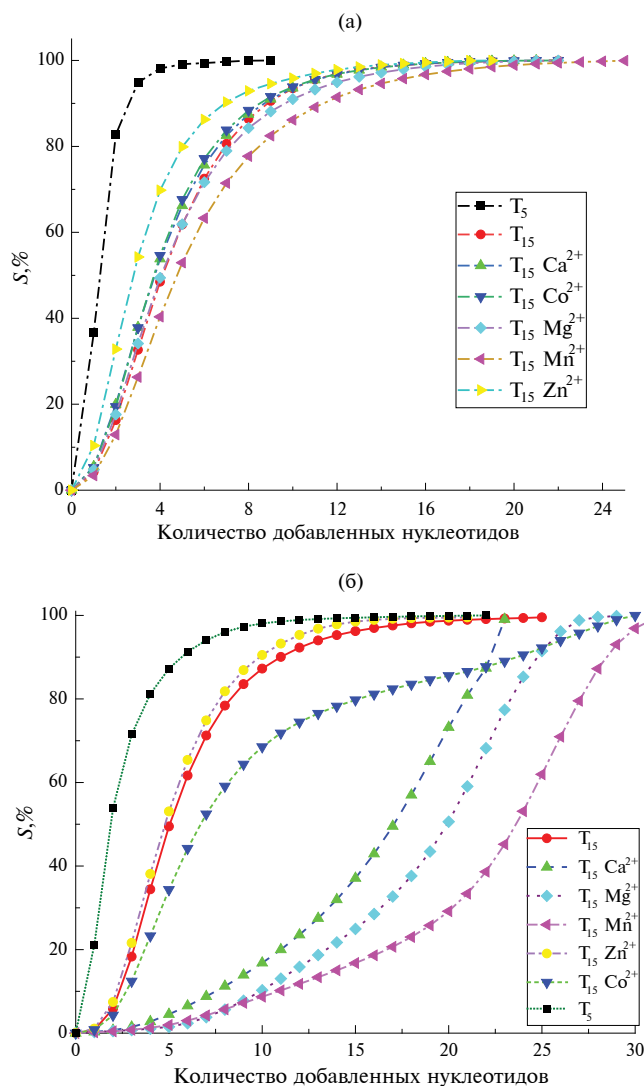


Рис. 6. Зависимость суммарной площади хроматографических пиков продуктов (S) от количества присоединенных TdT нуклеотидов к субстратам T_5 и T_{15} в реакционной смеси, содержащей: 40 нМ TdT, 0.2 мМ ТТР, 5 мМ АсОК, 2 мМ АсОТрис (рН 7.9), 1 мМ АсОМг, 0.25 мМ Me^{2+} (обозначено на легенде для T_{15}), 0.4 мкМ олигонуклеотида (а) и реакционной смеси, дополнительно содержащей 2 мМ EcSSB (б).

определяется длиной олигонуклеотида (использовали T_5 и T_{15}).

Внесение даже минимального количества белка EcSSB (1/100 от количества TdT) в реакционную смесь приводило к увеличению количества и смещению продуктов реакции в сторону более протяженных олигонуклеотидов, а значит и увеличению

процессивности фермента (рис. 7а, б). Изменение стехиометрических соотношений EcSSB/TdT, в диапазоне от 0 до 10, приводило к увеличению активности TdT (табл. 2), а на хроматограммах ясно просматривался переход с дистрибутивного механизма на процессивный (рис. 7а, б). При значениях

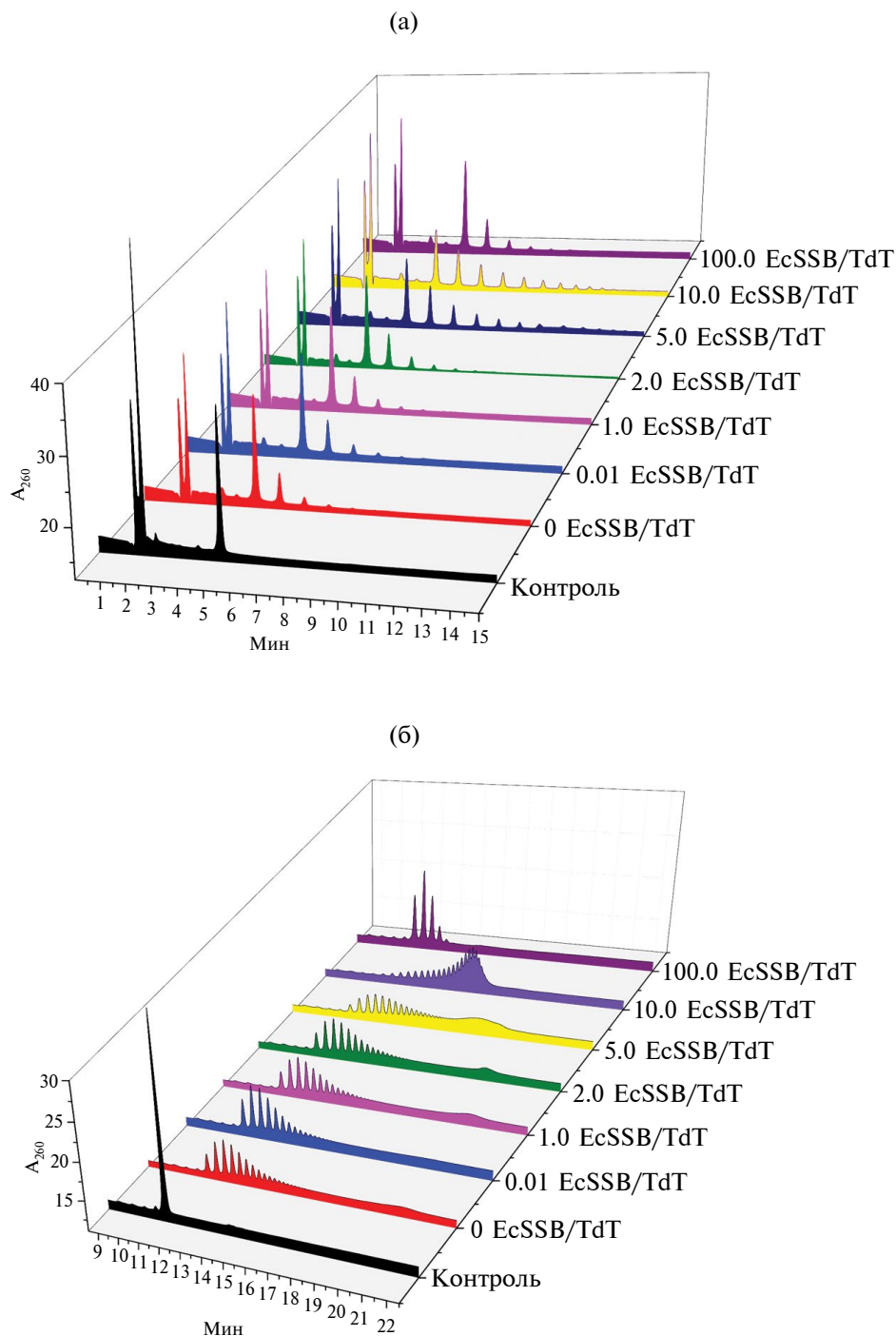


Рис. 7. Хроматограммы продуктов реакции при различных стехиометрических соотношениях EcSSB/TdT (субстрат T_5 , tR 5.6 мин, а) и EcSSB/TdT (субстрат T_{15} , tR 12.4 мин, б); контроль: 0.2 мМ ТТР, 5 мМ АсОК, 2 мМ АсОТрис (рН 7.9), 1 мМ АсОМg и 0.4 мкМ олигонуклеотида T_5 .

Таблица 2. Зависимость активности TdT от стехиометрического соотношения EcSSB/TdT для субстратов T₅ и T₁₅

EcSSB/TdT	Активность TdT (T ₅), Ед./мкг	Активность TdT (T ₁₅), Ед./мкг	EcSSB/T _n	Количество продуктов реакции (T ₅)	Количество продуктов реакции (T ₁₅)
0	2.42 ± 0.06	4.69 ± 0.05	0	6	22
0.01	2.69 ± 0.05	5.09 ± 0.03	0.003	8	22
0.10	2.82 ± 0.04	5.46 ± 0.09	0.30	9	22
0.2	2.82 ± 0.10	5.43 ± 0.10	0.06	9	23
0.5	2.84 ± 0.09	5.85 ± 0.06	0.15	10	25
1	2.96 ± 0.05	5.98 ± 0.04	0.3	11	26
2	3.16 ± 0.05	6.58 ± 0.21	0.6	14	28
5	5.13 ± 0.06	22.43 ± 0.17	1.5	21	30
10	5.79 ± 0.05	24.15 ± 0.23	3.0	13	24
100	5.18 ± 0.06	0.68 ± 0.16	30	8	5

соотношения в диапазоне 10–100, активность TdT начинала снижаться, но не блокироваться.

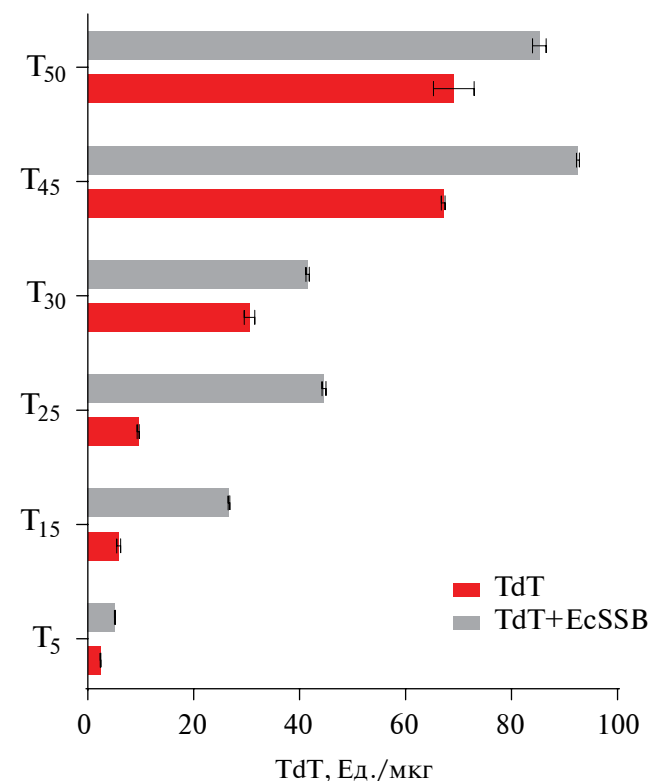
Это может объясняться конкурентным взаимодействием EcSSB с олигонуклеотидными субстратами и способностью легко диффундировать вдоль цепи ДНК [32]. Однако, большой избыток EcSSB негативно сказывался на работе фермента TdT (табл. 2). Таким образом, стехиометрическое соотношение EcSSB/TdT равное пяти, приводило к заметному росту активности и процессивности TdT. Для оценки эффекта конкурирования за связывание с олигонуклеотидным субстратом приведены значения EcSSB/T_n, характеризующие стехиометрическое отношение ДНК-связывающего белка (мономера) и олигонуклеотидного субстрата.

Влияние белка EcSSB на активность TdT при разной длине исходного олигонуклеотидного субстрата. Для всех исследованных олигонуклеотидных субстратов (T₅–T₅₀) добавление в реакционную смесь белка EcSSB приводила к повышению активности TdT (рис. 8, табл. Д2). Наиболее значительный эффект наблюдался для 15- и 25-звенных олигонуклеотидных субстратов.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что влияние EcSSB на активность TdT зависило от длины олигонуклеотидного субстрата, что в свою очередь указывало на то, что эффективное значение концентрации EcSSB определяется не соотношением EcSSB/TdT, а отношением концентрации EcSSB и олигонуклеотидного субстрата EcSSB/T_n (табл. 2), которое определяет присутствие в системе, свободной, несвязанной с EcSSB одноцепочечной ДНК. EcSSB связывает ДНК в виде тетрамера, а повышение активности TdT наблюдалось для значений EcSSB/T_n до 3.0. При EcSSB/T_n равном 4.0, должно происходить полное связывание олигонуклеотидного субстрата EcSSB.

Дальнейшее повышение значения EcSSB/T_n приводило к полному связыванию олигонуклеотидного субстрата тетрамером EcSSB.

Анализируя рис. 6а и 6б, можно сделать вывод о том, что присутствие в среде ДНК-связывающего белка EcSSB увеличивало активность TdT и обеспечивало образование более длинных продуктов элонгации цепи. Разница в распределении

**Рис. 8.** Влияние EcSSB на активность TdT для субстратов различной длины (EcSSB/TdT 5 : 1).

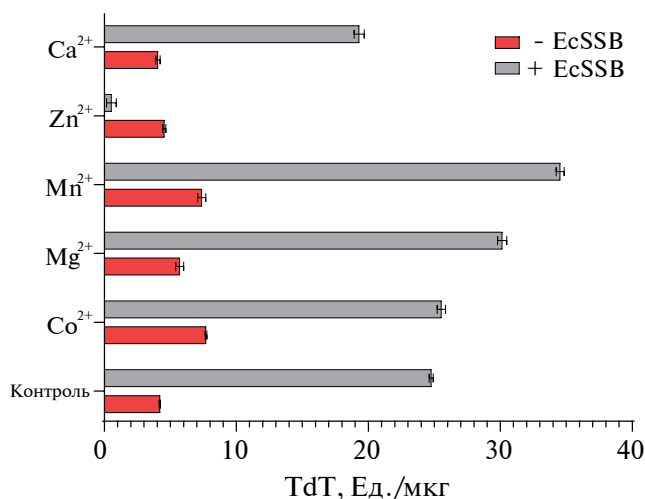


Рис. 9. Влияние белка EcSSB на ферментативную активность TdT в присутствии Me^{2+} : контроль: 40 нМ TdT, 0.2 мМ ТТР, 5 мМ АсОК, 2 мМ АсОТрис (pH 7.9), 1 мМ АсОМg, 0.4 мкМ олигонуклеотида T_{15} и 2 мкМ EcSSB.

продуктов реакции в значительной степени зависило от природы катиона Me^{2+} . При этом следует отметить, что природа катиона оказывала большее влияние на форму кривой распределения продуктов реакции в присутствии EcSSB. Известно, что катион в активном центре TdT способен регулировать процессивность фермента [30, 31]. Таким образом, можно предположить, что связывание олигонуклеотида с EcSSB, последующее взаимодействие с TdT и переход олигонуклеотида в активный

центр TdT, обеспечивают реализацию преимущественно процессивного механизма функционирования трансферазы.

Влияние белка EcSSB на ферментативную активность TdT в присутствии катионов двухвалентных металлов. Известно, что катионы Me^{2+} влияют не только на активность TdT, но и на прочность комплекса EcSSB-оцДНК, который зависит от радиуса катионов металла, с увеличением которого снижается необходимая концентрация соли для эффективного связывания ДНК [11].

По результатам анализа хроматограмм установлено, что наибольший эффект на каталитические свойства системы EcSSB-TdT оказывали катионы Mn^{2+} , приводя к смещению основных продуктов элонгации T_{15} от T_{17-23} к T_{38-43} (табл. Д2, рис. 10). Повышение концентрации Mg^{2+} приводило к увеличению активности фермента на 20% и количества продуктов T_{33-40} . В тоже время, ионы Ca^{2+} снижали активность, но увеличивали процессивность фермента и количество пролонгированных олигонуклеотидов до T_{29-37} . Этот эффект, возможно, связан с большим радиусом ионов Ca^{2+} , приводящим к стерическому затруднению в активном центре фермента и повышению сродства EcSSB к оцДНК [19]. Присутствие ионов Zn^{2+} в реакционной смеси приводило к снижению активности TdT.

Таким образом, использование EcSSB в присутствии катионов Mn^{2+} или Co^{2+} в ферментативном синтезе с участием TdT существенно влияло на ход ферментативной реакции. Причиной изменения активности и процессивности TdT могла быть не

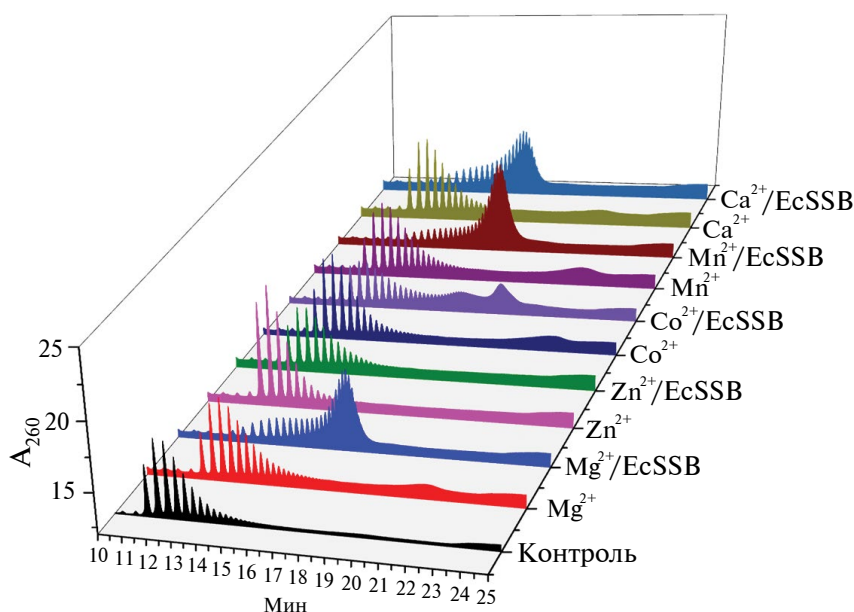


Рис. 10. Хроматограммы продуктов элонгации T_{15} (tR 12.4 мин), отражающие влияние катионов Me^{2+} и EcSSB: контроль: 40 нМ TdT, 0.2 мМ ТТР, 5 мМ АсОК, 2 мМ АсОТрис (pH 7.9), 1 мМ АсОМg, 0.25 мМ Me^{2+} , 0.4 мкМ T_{15} и 2 мкМ EcSSB.

только стабилизация одноцепочечной структуры олигонуклеотидов, но и межбелковые взаимодействия между EcSSB и TdT, которые одновременно связывались с олигонуклеотидом.

Влияние белка Sso7d на активность фермента TdT.

В общем случае от стабилизирующего двуцепочечную ДНК белка Sso7d следовало ожидать ингибирующего действия на активность TdT как в случае двуцепочечной ДНК, так и в случае олигонуклеотидов смешанного состава. Для гомополимеров типа T_n и dA_n , не образующих межцепочечные водородные связи, ингибирующее действие Sso7d не очевидно. Для проверки гипотезы белок Sso7d использовали в эквимольном соотношении с TdT, а условия реакции и анализа использовали как в эксперименте с EcSSB.

Исследование олигонуклеотидных субстратов T_5 , T_{15} , T_{35} в реакции продемонстрировало, что активность TdT возрастала с увеличением протяженности олигонуклеотида (рис. 11). Полученные результаты согласовывались с данными, полученными для серии олигонуклеотидов dA_n ($n = 4-50$) [9]. Кинетический анализ подтвердил, что при возрастании олигонуклеотидной цепи dA_n от 4 до 50, K_M уменьшалось от 160 до 1 мкМ [9]. Для субстрата T_{15} присутствие катионов Co^{2+} оказывало активирующее влияние, а катионы Zn^{2+} , напротив, снижали активность TdT. Во всех случаях присутствие в системе Sso7d приводило к снижению активности TdT.

В отсутствие Me^{2+} ингибирующее действие Sso7d возрастало с ростом длины олигонуклеотидной цепи, что указывает на то, что механизм ингибирования не связан с белок-белковыми взаимодействиями Sso7d и TdT, а скорее опосредован конкурентным взаимодействием Sso7d с ДНК.

Катионы Co^{2+} и Mn^{2+} изначально использовались как замена Mg^{2+} в буферных системах для TdT

для дестабилизации ДНК-дуплексов, особенно в реакции удлинения тупых концов [5]. Таким образом, можно предположить, что влияние катионов Co^{2+} , в реакционной смеси, могло быть причиной не столь выраженного ингибирующего эффекта белка Sso7d.

* * *

В настоящей работе впервые исследовано влияние белков, неспецифично связывающих и стабилизирующих одноцепочечную (EcSSB) и двуцепочечную (Sso7d) ДНК, на активность терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы в отношении гомополимерных субстратов T_n .

Выдвинута гипотеза о том, что ДНК-связывающие белки способны влиять на активность TdT путем разрушения/стабилизации вторичных структур субстрата и/или путем конкурентного связывания с субстратом. Для оценки альтернативных эффектов ДНК-связывающих белков использованы модельные системы с гомополимерными субстратами T_n , не склонными к образованию вторичных структур.

Sso7d, связывающий и стабилизирующий двуцепочечную ДНК, приводил к небольшому (до 15%) снижению активности TdT для субстратов T_5 и T_{15} и более выраженному для T_{35} (до 30%).

При этом обнаружено существенное увеличение активности TdT в присутствии EcSSB. Изучение характера зависимости распределения продуктов реакции по количеству добавленных ферментом TdT нуклеотидов от присутствия EcSSB и катионов Me^{2+} , позволило установить, что EcSSB увеличивал процессивность фермента. EcSSB оказывал максимальный эффект на активность TdT в близком к эквимольному стехиометрическому соотношении $(EcSSB)_4:TdT$ в присутствии катионов Mn^{2+} . Вероятной причиной изменения процессивности TdT являлись белок-белковые взаимодействия между

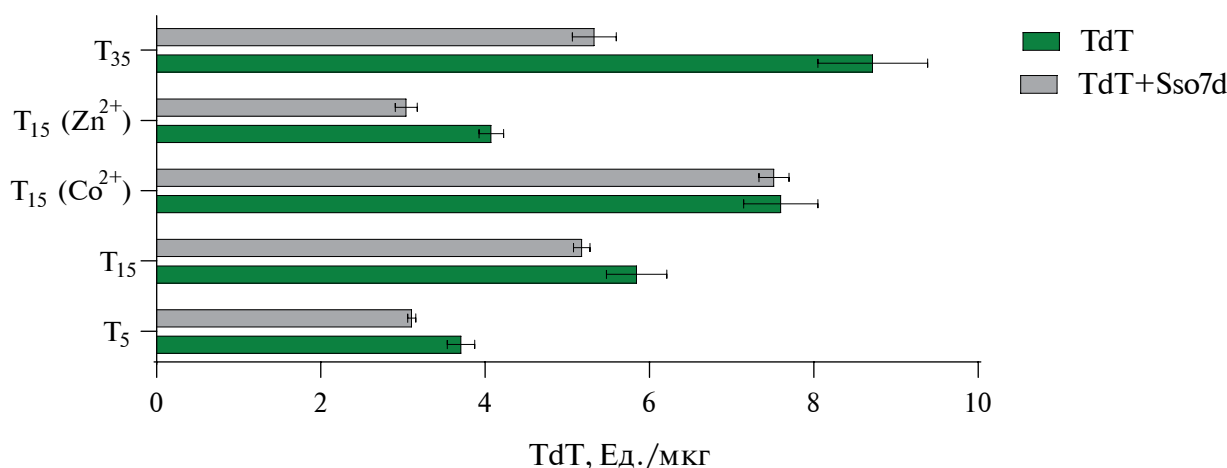


Рис. 11. Влияние Sso7d на активность TdT в реакции элонгации T_5 , T_{15} , T_{35} в различных условиях. Отражено влияние катионов Zn^{2+} и Co^{2+} на элонгацию T_{15} .

ферментом и ДНК-связывающим белком. Следует отметить, что специфические взаимодействия между гетерологичными белками маловероятны, однако полностью исключить их невозможно, учитывая то, что белки, связывающие одноцепочечную ДНК, широко распространены в природе и представлены во всех царствах живых существ. Учитывая существенную разницу в значении изоэлектрических точек белков TdT (7.84) и EcSSB (6.12), а также возможность диполь-дипольных взаимодействий, неспецифические взаимодействия также могли быть значимыми в исследуемой системе.

Таким образом, выдвинуто предположение, что механизм влияния EcSSB на TdT заключается не только в стабилизации одноцепочечной структуры олигонуклеотидов, а может быть следствием межбелковых взаимодействий, которые переключают механизм работы TdT на процессивный, при котором тетрамер EcSSB в составе комплекса передает субстрат в активный центр TdT, а катион Mn^{2+} дополнительно увеличивает эффект.

Последующие исследования других гомополимерных субстратов, а также субстратов, формирующих внутри- и межцепочечные взаимодействия в системах, содержащих TdT и ДНК-связывающие белки позволят более полно понять молекулярные механизмы обнаруженных эффектов.

Таким образом, продемонстрированные в данной работе эффекты ДНК-связывающих белков на активность TdT, а также установленные закономерности, могут найти применение как в белковой инженерии при создании гибридных мультидоменных белков на основе TdT, так и при разработке новых принципов ферментативного синтеза ДНК *de novo*.

ВКЛАД АВТОРОВ. А.В. Янцевич — концепция и руководство работой; А.Б. Саченко — проведение экспериментов; В.В. Щур — синтез генов; А.Б. Саченко, С.А. Усанов, А.В. Янцевич — обсуждение результатов исследования; А.Б. Саченко — подготовка рукописи; А.В. Янцевич — редактирование рукописи.

БЛАГОДАРНОСТИ. Авторы благодарят Ю.П. Буренкову за помощь при создании экспрессионных конструкций, А.И. Жолнеровича за помощь при выполнении экспериментов по определению активности терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы, М. А. Шапиро и Я. В. Диченко за помощь в хроматографической очистке белков.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ № X21M-056 и грантов Национальной академии наук Беларуси № 2023-27-021 и № 2021-04-22.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Настоящая статья не содержит описания каких-либо

исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoose A., Vellacott R., Storch M., Freemont P.S., Ryadnov M.G. // *Nat. Rev. Chem.* 2023. V. 7. P. 144–161.
2. Stemmer W.P., Cramer A., Ha K.D., Brennan T.M., Heyneker H.L. // *Gene*. 1995. V. 164. P. 49–53.
3. Ma S., Saaem I., Tian J. // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. P. 147–154.
4. Kosuri S., Church G.M. // *Nat. Meth.* 2014. V. 11. P. 499–507.
5. Grosse F., Manns A. // *Meth. Mol. Biol.* 1993. V. 16. P. 95–105.
6. Bollum F.J. // *J. Biol. Chem.* 1960. V. 235. P. 2399–2403.
7. Church G.M., Gao Y., Kosuri S. // *Science*. 2012. V. 337. P. 1628.
<https://doi.org/10.1126/science.1226355>
8. Verardo D., Adelizzi B., Rodriguez-Pinzon D.A., Moghaddam N., Thomee E., Loman T. et al. // *Science Adv.* 2023. V. 9. P. eadi0263.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.adi0263>
9. Deibel M.R., Jr., Coleman M.S. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 4206–4212.
10. Sachanka A.B., Trawkina M., Shchur V.V., Usanov S.A., Yantsevich A.V. // *Proc. Nat. Acad. Sci. Bel. Chem. Ser.* 2023. V. 55. P. 225–233.
11. Steitz T.A., Steitz J.A. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 6498–6502.
12. Barthel S., Palluk S., Hillson N.J., Keasling J.D., Arlow D.H. // *Genes*. 2020. V. 11.
<https://doi.org/10.3390/genes11010102>
13. Wang Y., Prosen D.E., Mei L., Sullivan J.C., Finney M., Vander Horn P.B. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1197–1207.
14. Dolgova A.S., Stukolova O.A. // *3 Biotech.* 2017. V. 7. P. 128.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0745-2>
15. Baumann H., Knapp S., Lundbäck T., Ladenstein R., Härd T. // *Nat. Mol. Biol.* 1994. V. 1. P. 808–819.
16. Shehi E., Serina S., Fumagalli G., Vanoni M., Consonni R., Zetta L. et al // *FEBS Lett.* 2001. V. 497. P. 131–136.
17. Guagliardi A., Napoli A., Rossi M., Ciaramella M. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 267. P. 841–848.
18. McAfee J.G., Edmondson S.P., Datta P.K., Shriver J.W., Gupta R. // *Biochem.* 1995. V. 34. P. 10063–10077.
19. Bujalowski W., Overman L.B., Lohman T.M. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 4629–4640.
20. Bochkarev A., Bochkareva E., Frappier L., Edwards A.M. // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 4498–4504.

21. Chédin F., Seitz E.M., Kowalczykowski S.C. // Trends Biochem. Sci. 1998. V. 23. P. 273–277.
22. Schwarz K., Hansen-Hagge T., Bartram C. // Nucleic Acids res. 1990. V. 18. P. 1079.
<https://doi.org/10.1093/nar/18.4.1079>
23. Ronaghi M. // Anal. Biochem. 2000. V. 286. P. 282–288.
24. Yantsevich A.V., Shchur V.V., Usanov S.A. // SLAS tech. 2019. V. 24. № 6. P. 556–568.
<https://doi.org/10.1177/2472630319850534>
25. Yantsevich A.V., Dzichenka Y.V., Ivanchik A.V., Shapiro M.A., Trawkina M., Shkel T.V., et al. // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2017. V. 53. № 2. P. 173–187.
26. Shlyakhtenko L.S., Lushnikov A.Y., Miyagi A., Lyubchenko Y.L. // Biochem. 2012. V. 51. P. 1500–1509.
27. Kuffel A., Gray A., Daeid N.N. // Int. J. Leg. Med. 2021. V. 135. P. 63–72.
28. Johns D., Richard Morgan A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 72. P. 840–849.
29. Kato K.I., Goncalves J.M., Houts G.E., Bollum F.J. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 2780–2789.
30. Flamme M., Hanlon S., Iding H., Puente K., Sladojevich F., Hollenstein M. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2021. V. 48. P. 128242.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128242>
31. Aleksandra A.K., Timofey E.T., Irina V.A., Nadezhda A.T., Olga S.F., Nikita A.K. // Life Sci. All. 2022. V. 5. P. e202201428.
<https://doi.org/10.26508/lisa.202201428>
32. Kuznetsov S.V., Kozlov A.G., Lohman T.M., Ansari A. // J. Mol. Biol. 2006. V. 359. P. 55–65.

Effect of DNA-Binding Proteins on Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity in Systems with Homopolymer Substrates

A. B. Sachanko^a, V. V. Shchur^a, S. A. Usanov^a, and A. V. Yantsevich^{a,*}

^aInstitute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Belarus

*e-mail: yantsevich@iboch.by

In the current work we tested single strand binding protein from *E. coli* (EcSSB) and DNA-binding protein from *S. solfataricus* (Sso7d) to evaluate its effects on TdT activity for homopolymer substrates (T_n), that unable to form double helix structures. We showed a significant increase in TdT activity after adding of EcSSB even on the example of homopolymer substrates. Effects demonstrated open application of DNA binding proteins in TdT engineering and DNA-printing. The addition of EcSSB to the reaction mixture led to a significant increase in TdT activity and a shift of the reaction products towards longer oligonucleotides. The maximum effect was observed in a close to equimolar stoichiometric ratio (EcSSB)₄:TdT in the presence of Mn²⁺ cations. In addition, the presence of Sso7d in the reaction mixture led to a slight (up to 15%) decrease in TdT activity for substrates T₅ and T₁₅ and a more pronounced decrease for T₃₅ (up to 30%). At the same time, Co²⁺ cations reduced the inhibitory effect of Sso7d. The patterns and relationships established through our research have potential applications in various fields. Specifically, they can be utilized in protein engineering for the development of fusion proteins that are based on TdT. Furthermore, these findings can contribute to the advancement of novel enzymatic principles for *de novo* DNA synthesis.

Keywords: DNA nucleotidyltransferase, DNA-binding protein, EcSSB, Sso7d, *de novo* DNA synthesis

УДК 620.193.81

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ОБРАСТАНИЙ ТИТАНОВЫХ ПЛАСТИН В ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ ЧЕРНОГО И БЕЛОГО МОРЕЙ

© 2024 г. А. Л. Брюханов¹, А. С. Шутова², К. А. Комарова², Т. А. Семенова^{2, *},
А. А. Семенов¹, В. А. Карпов²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, 119234 Россия

²Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН,
Москва, 119071 Россия

*e-mail: tashino@mail.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

С помощью высокопроизводительного секвенирования варибельного региона V3–V4 гена 16S рРНК исследован полный филогенетический состав микробных сообществ, развивающихся на поверхности титановых пластин в водной толще прибрежной зоны Черного и Белого морей. Показано наличие в этих обрастаниях потенциально коррозионно-активных микроорганизмов различных физиологических групп, таких, как сульфатредуцирующие бактерии, ацидофильные железooksисляющие бактерии и археи, сероooksисляющие и нитрифицирующие бактерии. В обрастаниях титановых пластин, экспонированных в Черном море, наиболее распространенными микроорганизмами оказались некультивируемые сульфатредуцирующие бактерии порядка *Desulfotomaculales*, на которых приходилось 8.13% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК, а также ацидофильные железooksисляющие бактерии родов *Acidiferrobacter* (5.47%), *Acidithiobacillus* (4.52%) и *Acidiphilium* (2.55%). Ацидофильные археи составляли вплоть до 7.97% от всех прочтений. В обрастаниях титановых пластин, экспонированных в Белом море, наиболее распространенными также оказались ацидофильные бактерии из порядков *Acidiferrobacterales* и *Acidithiobacillales* (7.68%), а также ацидофильные археи из порядка *Thermoplasmatales* (7.43%). В относительно большом количестве были представлены и некультивируемые сульфатредуцирующие бактерии порядка *Desulfotomaculales* (6.61%).

Ключевые слова: микробные сообщества, высокопроизводительное секвенирование, сульфатредуцирующие бактерии, ацидофильные железобактерии, титан, биокоррозия, Черное море, Белое море

DOI: 10.31857/S0555109924060046 EDN: QGSFY5

Микробиологическая коррозия имеет большое значение при эксплуатации изделий из различных металлов в морской воде. По этой причине необходимо выявлять связи между экологической обстановкой, физико-химическим состоянием исследуемых материалов из металлических сплавов, а также динамикой развития на них обрастаний и формирования биоповреждений. Особенно эти процессы интересны для изучения в морских экосистемах, где скорость биокоррозии может быть крайне высока.

Одной из наиболее опасных групп коррозионно-активных микроорганизмов являются анаэробные сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), стимулирующие развитие и усиление биокоррозионных процессов как за счет образования ими весьма реакционноспособного сероводорода, так

и в ходе катодной деполяризации участков корродирующей металлической поверхности из-за потребления клетками водорода и формирования дополнительных гальванических пар неравномерно растущими биопленками и отложениями сульфидов металлов [1–3].

Также биокоррозию вызывают аэробные кислотообразующие бактерии, прежде всего, сероooksисляющие, которые образуют серную кислоту в процессе окисления восстановленных неорганических серных соединений. Среди тиобацилл коррозионно-активными являются железooksисляющие (например, *Thiobacillus ferrooxidans*) и ацидофильные (например, *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*) виды [4]. К коррозионно-активным кислотообразующим микроорганизмам относят также нитрифицирующие бактерии,

которые окисляют ионы аммония и, на второй стадии, нитриты, образуя азотную кислоту [5].

Важнейшим фактором для развития обрастаний, приводящих к коррозионным процессам, являются окружающие условия, в которых эксплуатируются металлические изделия — освещенность, температура, соленость воды, pH, аэрация, концентрации ключевых биогенных элементов — эти параметры могут значительно различаться в разных морях. Выявление влияния филогенетического состава микробных сообществ на потенциальную коррозионность морских экосистем в разных климатических зонах является интересной и важной экспериментальной задачей.

На степень обрастания и коррозии изделий влияет и использование определенного металла или сплава. Сталь и стальные сплавы без биоцидного эффекта в процессе длительной экспозиции в морской среде подвержены значительной электрохимической и биологической коррозии с периодическим отслаиванием продуктов коррозии вместе с микробным сообществом. Более устойчивы к коррозионным процессам медьсодержащие сплавы с биоцидным эффектом, задерживающие развитие некоторых групп микроорганизмов, а также не подверженный глубинной коррозии нейтральный титан и его сплавы.

Цель работы — сравнительное исследование качественного и количественного филогенетического состава микробных сообществ, развивающихся на поверхности титановых пластин в прибрежных зонах Черного (в районе биоклиматической станции ИПЭЭ РАН, п. Малый Утриш, Краснодарский край) и Белого морей (в районе Беломорской биологической станции МГУ, п. Приморский, республика Карелия), а также определение доли микроорганизмов, в том числе и некультивируемых, потенциально способных к биокоррозии.

МЕТОДИКА

Исследование особенностей и динамики обрастаний титановых пластин на Черном море проводили в заливе в районе Биоклиматической Исследовательской станции (БКИС) ИПЭЭ РАН “Утриш” (Россия).

Титановые пластины (60 × 170 × 2 мм) были погружены в море в ноябре 2020 г. с плавучей платформы на глубину 1.5 м от поверхности воды в 25 м от береговой линии, глубина до дна составляла 6 м. Микроорганизмы, составлявшие основу образованных биопленок (бактерии и археи, диатомовые микроводоросли), начали развиваться на поверхности титановых пластин весной, когда вода в акватории прогрелась до 13–15°C. Летом 2021 г. температура морской воды достигала 27°C. Соскобы биопленок на молекулярный филогенетический

анализ проводили через 10 мес. экспозиции, в сентябре 2021 г.

Исследование особенностей и динамики обрастаний титановых пластин на Белом море проводили в заливе у полуострова Киндо в районе Беломорской биологической станции (ББС им. Н.А. Перцова) МГУ. Пластины (60 × 170 × 2 мм) были погружены в море в сентябре 2020 г. в 20 м от береговой линии на глубину 1.5–2.0 м от поверхности воды (в зависимости от прилива-отлива), глубина до дна составляла 6 м. В связи с периодом ледяного покрова образцы были установлены на специальной конструкции, закрепленной на нужной глубине (ниже уровня промерзания) с помощью грузов-якорей и поплавков. Соскобы биопленок на молекулярный филогенетический анализ проводили через 10 мес. экспозиции, в июне 2021 г.

Гидрологические и гидрохимические характеристики морской воды в период экспонирования образцов, включая концентрации ключевых биогенных элементов, приведены в табл. 1.

Электронное микроскопирование титановых образцов выполнено с использованием оборудования ЦКП “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН: установки для напыления покрытий Q150R ES Plus (“Quorum Technologies Ltd.”, Великобритания) и растрового электронного микроскопа TESCAN MIRA 3 LMN (“TESCAN”, Чехия), оснащенного системой энерго-дисперсионного анализа AZtecOne X-act (“Oxford Instruments”, Великобритания), с катодом Шоттки.

Для анализа филогенетического состава микробных сообществ обрастаний титановых пластин применяли высокопроизводительное секвенирование фрагментов генов 16S рРНК, содержащих переменный регион V3–V4, с использованием в качестве ПЦР-матрицы геномной ДНК, выделенной из образцов соскобов обрастаний. После отбора образцы хранили при 4°C в буферном растворе,

Таблица 1. Среднегодовые гидрологические и гидрохимические характеристики морской воды в районах испытаний образцов в 2020–2021 гг.

Характеристики воды	БКИС “Утриш”	ББС
Температура, °C	14.7	7.3
Соленость, ‰	16.4	25.2
pH	8.38	8.0
Растворенный O ₂ , мг/л	8.8	12.0
PO ₄ ³⁻ , мкг/л	15.0	н/д
NO ₂ ⁻ , мкг/л	1.2	0.4
NO ₃ ⁻ , мкг/л	10.0	н/д
NH ₄ ⁺ , мкг/л	25.0	3.5

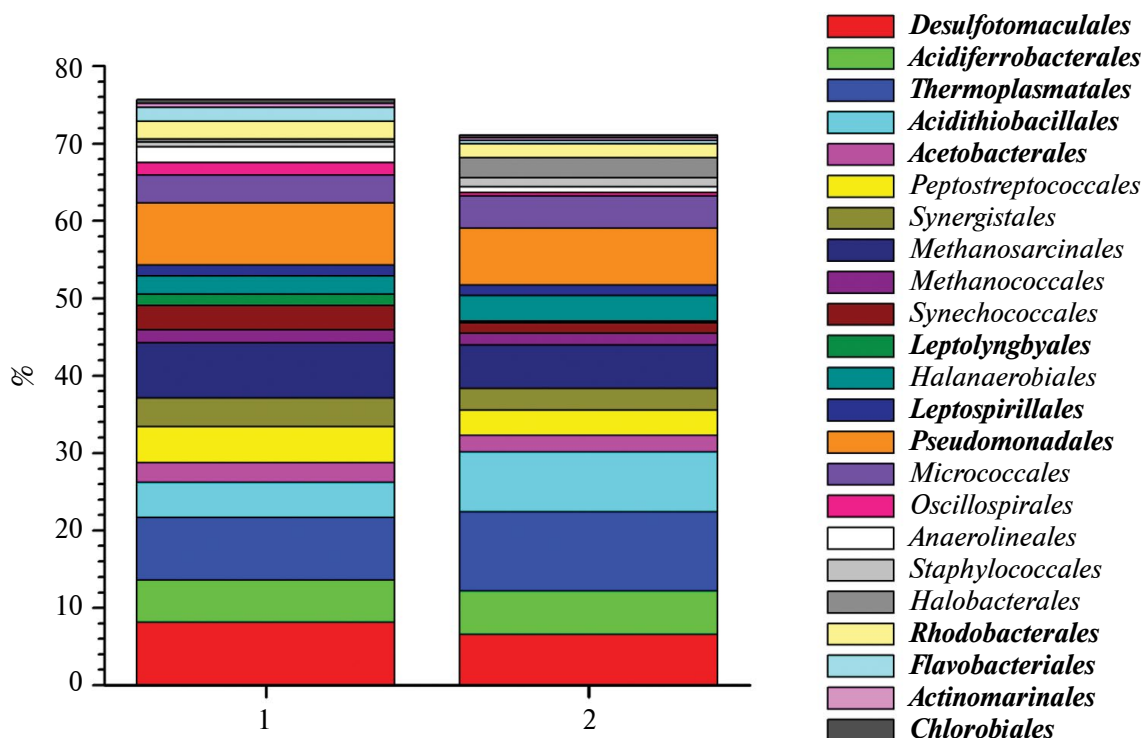


Рис. 1. Распределение ключевых групп микроорганизмов (в % от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК) на уровне порядков в обрастаниях титановых пластин, экспонированных в прибрежной зоне Черного (1) и Белого (2) морей. Жирным шрифтом выделены группы, включающие коррозионно-активные микроорганизмы.

содержащем 0.15 M NaCl и 0.1 M Na₂ЭДТА (pH 8.0). Геномную ДНК выделяли с помощью набора FastDNA Spin Kit for Soil ("MP Biomedicals", США) в соответствии с рекомендациями производителя. Секвенирование фрагментов генов 16S рРНК было выполнено с применением научного оборудования ЦКП "Биоинженерия" ФИЦ Биотехнологии РАН – на геномном анализаторе MiSeq ("Illumina", США) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов, чтение с двух концов). Парные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы FLASH [6]. Для определения размера кластеров (оперативных таксономических единиц, ОТЕ) в каждом образце, все исходные объединенные чтения накладывались на репрезентативные последовательности ОТЕ с минимальной идентичностью 97% по всей длине с помощью программы USEARCH v.11 [7]. Таксономическую классификацию полученных ОТЕ проводили по базе последовательностей 16S рРНК RDP database [8].

Полученные последовательности генов 16S рРНК были депонированы в NCBI Sequence Read Archive (SRA), они доступны в BioProject под номером PRJNA1184748.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В северной (Белое море) и субтропической (Черное море) климатических зонах проведено

исследование полного состава микробных сообществ обрастаний титановых пластин в верхней освещенной части водной толщи прибрежной зоны, показано наличие потенциально коррозионно-активных микроорганизмов различных физиологических групп, таких, как сульфатредуцирующие бактерии, ацидофильные железоокисляющие бактерии и археи, сероокисляющие и нитрифицирующие бактерии.

Филогенетический анализ состава микробного сообщества в обрастаниях титановой пластины, экспонированной на Черном море в условиях освещенности. В образце обрастаний с титановой пластины, экспонированной на Черном море в прибрежной зоне в условиях освещенности, был детектирован 851 вид микроорганизмов, включая некультивируемые и неидентифицированные до уровня вида группы. Наиболее распространенными микроорганизмами оказались строго анаэробные сульфатредуцирующие бактерии порядка *Desulfotomaculales* класса *Desulfotomaculia* филума *Firmicutes*, на которых приходилось 8.13% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК (рис. 1). Бактерии порядка *Desulfotomaculales* весьма коррозионно-активны, поскольку образуют H₂S в процессе диссимиляционной сульфатредукции, окисляют молекулярный водород и вызывают катодную деполаризацию на поверхности металла [9]. Представители порядка имеют форму палочек различной длины,

образуют эндоспоры, многие подвижны и способны к азотфиксации. Широко представлены в природе — их часто обнаруживают в почвах, морской водной толще и донных отложениях, геотермальных источниках, шахтных и сточных водах, пищеварительном тракте насекомых и рубце жвачных животных [10].

В относительно большом количестве в образце были представлены также бактерии рода *Acidiferrobacter* (семейство *Acidiferrobacteraceae* порядка *Acidiferrobacterales* класса *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria*) и рода *Acidithiobacillus* (семейство *Acidithiobacillaceae* порядка *Acidithiobacillales* класса *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria*) — 5.47% и 4.52% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК соответственно.

Acidiferrobacter spp. являются ацидофильными термотолерантными факультативно анаэробными бактериями, способными к окислению железа (II) и элементарной серы. Типовой вид *Acidiferrobacter thiooxydans* ранее был выделен из отвалов горнорудной промышленности [11]. Бактерии рода *Acidithiobacillus* — ацидофильные автотрофные (источником углерода является CO₂, фиксируемый в трансальдозном варианте цикла Кальвина) микроорганизмы, способные для получения энергии к окислению тетратионов, сульфидов, элементарной серы, а также, часто, и двухвалентного железа с образованием железа (III) и серной кислоты [12]. Некоторые виды способны к азотфиксации, росту на молекулярном водороде, использованию окисных соединений железа в качестве терминального акцептора электронов. Это подвижные палочковидные формы, мезофилы, преимущественно выделяемые из кислых биотопов или микрозон с низким pH на поверхности нейтральных минеральных образований — железосерных минералов (отложений пирита), закисленных почв, канализационных коллекторов, биопленок в известковых пещерах, отходов обогащения полезных ископаемых [13]. *Acidithiobacillus* играют большую роль в биогидрометаллургии (экстрагирование металлов из бедных руд, минералов и сточных вод за счет их окисления бактериями), дренаже кислых шахтных вод, биоремедиации (солюбилизация металлов в виде сульфатов), а также в процессах биокоррозии стальных и железобетонных металлоконструкций (за счет окисления железа и образования серной кислоты из сероводорода) [14, 15].

Кроме того, 2.55% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК приходилось на экстремально ацидофильных (различные штаммы растут при pH 2.0–6.0) бактерий рода *Acidiphilium* (семейство *Acetobacteraceae* порядка *Acetobacterales* класса *Alphaproteobacteria* филума *Proteobacteria*). Это гетеротрофные микроорганизмы, часто способные к восстановлению железа (III). Преимущественно аэробные, мезофильные, часто подвижные

палочковидные бактерии, обнаруживаемые в кислых минеральных природных экосистемах [16].

Также в относительно большом количестве в обрастаниях титановых пластин, экспонированных в прибрежных черноморских водах, были детектированы и ацидофильные археи — некультивируемые представители родов *Ferroplasma* и *Acidiplasma* (4.93 и 3.04% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК соответственно). Оба рода относят к семейству *Ferroplasmaceae* порядка *Thermoplasmatales* класса *Thermoplasmata* филума *Thermoplasmata*. Археи рода *Ferroplasma* — ацидофильные кокковидные микроорганизмы, лишенные клеточной стенки (плеоморфные). Все представители способны к окислению железа (II) до железа (III) для получения энергии, являются хемотротрофами; способны к фиксации CO₂, но выделенные в чистые культуры виды нуждаются в органических источниках углерода и в отсутствие железа осуществляют хемотротрофный рост. Предпочитают местообитания с очень низким pH (от 0 до 2.0), например, кислые шахтные воды [17, 18]. Это мезофильные или умеренно термофильные археи, аэробы или факультативные анаэробы (*Ferroplasma thermophilum* в анаэробных условиях восстанавливает железо (III) и сульфаты), некоторые виды очень устойчивы к высоким концентрациям меди и мышьяка. *Ferroplasma* spp. участвуют в биогеохимическом цикле железа, находят применение в биогидрометаллургии (экстрагирование металлов из бедных руд, минералов типа халькопирита и сточных вод) [19]. Археи рода *Acidiplasma* также являются облигатными ацидофилами, типовой вид был выделен из гидротермального источника на острове Вулькано, Италия. Они способны к окислению железа (II) в аэробных условиях и восстановлению железа (III) в анаэробных условиях [20].

Среди потенциально коррозионно-активных микроорганизмов, способных к окислению железа (II), надо отметить также некультивируемых представителей рода *Leptospirillum* (семейство *Leptospirillaceae* порядка *Leptospirillales* класса *Leptospirillia* филума *Nitrospirota*), на долю которых приходилось 1.41% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК. В частности, Fe-окисляющая бактерия *L. ferriphilum* способствует образованию кислых шахтных вод [21].

В образцах черноморских обрастаний титановых пластин, экспонировавшихся в условиях освещенности, в относительно большом количестве были обнаружены также бактерии рода *Acinetobacter* (семейство *Moraxellaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria*) — 4.16% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК. *Acinetobacter* spp. — облигатно аэробные бактерии, хемотротрофы. Это преимущественно сапрофитные микроорганизмы (хотя среди них встречаются и

патогены — источники внутрибольничных инфекций), широко распространенные в почвенных и водных биотопах (в почве они осуществляют, в том числе, и минерализацию ароматических соединений), способные существовать в широком диапазоне температур и устойчивые ко многим антибиотикам [22]. Значительна относительная численность некультивируемых бактерий родов *Caminicella* (семейство *Caminicellaceae* порядка *Peptostreptococcales*/*Tissierellales* класса *Clostridia* филума *Firmicutes*) — 3.73% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК; *Thermovirga* (семейство *Synergistaceae* порядка *Synergistales* класса *Synergistia* филума *Synergistota*) — 3.65% и *Synechococcus* (семейство *Cyanobiaceae* порядка *Synechococcales* класса *Cyanobacteriia* филума *Cyanobacteria*) — 3.13%. *Caminicella* spp. — анаэробные термофильные (типовой вид выделен из гидротермы в Тихом океане) гетеротрофные бактерии. Подвижные палочки, образующие эндоспоры [23]. Бактерии рода *Thermovirga* — анаэробные подвижные микроорганизмы, типовой вид был выделен из нефтяной скважины в Северном море [24]. *Synechococcus* spp. — очень широко распространенные в подповерхностных (хорошо освещенная эвфотическая зона) морских и пресных водах кокковидные преимущественно подвижные цианобактерии, один из наиболее важных компонентов прокариотического автотрофного фотосинтезирующего пикопланктона [25].

Среди характерных для морских экосистем бактерий необходимо отметить также обнаружение представителей рода *Marinobacterium* (семейство *Nitrospiraceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria*) — 1.84% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК; рода *Halocella* (семейство *Halanaerobiaceae* порядка *Halanaerobiales* класса *Halanaerobiia* филума *Halanaerobiaeota*) — 1.59%; клады SBR1031 (класс *Anaerolineae* филума *Chloroflexi*) — 1.48%; семейства *Leptolyngbyaceae* (порядок *Leptolyngbyales* класса *Cyanobacteriia* филума *Cyanobacteria*) — 1.46%; семейства *Rhodobacteraceae* (порядок *Rhodobacterales* класса *Alphaproteobacteria* филума *Proteobacteria*) — 1.33%; рода *Rothia* (семейство *Micrococcaceae* порядка *Micrococcales* класса *Actinobacteria* филума *Actinobacteriota*) — 1.23% и рода *Anaerobacterium* (семейство *Hungateiclostridiaceae* порядка *Oscillospirales* класса *Clostridia* филума *Firmicutes*) — 1.17%. *Marinobacterium* spp. — гетеротрофные подвижные бактерии палочковидной формы, обнаруживаемые в морских водах и донных отложениях [26]. Бактерии рода *Halocella* — строго анаэробные и умеренно галофильные микроорганизмы. Типовой вид *H. cellulosilytica* был выделен из гиперсоленой лагуны озера Сиваш в Крыму [27]. Представители семейства *Rhodobacteraceae* — хемоорганотрофные и фотогетеротрофные бактерии, многие из которых встречаются в водных экосистемах [28].

В обрастаниях титановых пластин также присутствовали строго анаэробные метаногенные археи родов *Methanlobus*, *Methanohalophilus*, *Methermicoccus* и *Methanothermococcus* (2.79, 2.46, 1.83 и 1.68% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК соответственно). Метаногены родов *Methanlobus* и *Methanohalophilus* (семейство *Methanosarcinaceae* порядка *Methanosarcinales* класса *Methanosarcinia* филума *Halobacterota*) используют метилированные соединения в качестве субстрата (не способны использовать $\text{CO}_2 + \text{H}_2$, ацетат или формиат). Наиболее филогенетически близкий к детектированным в образцах обрастаний метаногенам *Methanlobus zinderi* был выделен из угольного пласта, но другие представители рода были также обнаружены в анаэробных озерных и морских осадках [29]. *Methanohalophilus* spp. — умеренно галофильные археи, часто встречаются в солончаках [30]. *Methanothermococcus* spp. (семейство *Methanococcaceae* порядка *Methanococcales* класса *Methanococci* филума *Euryarchaeota*) — подвижные метаногенные археи, растущие на ацетате. Типовой представитель рода *Methermicoccus* (семейство *Methermicoccaceae* порядка *Methanosarcinales* класса *Methanosarcinia* филума *Halobacterota*) — *Methermicoccus shengliensis* был выделен из вод нефтяного месторождения в Китае. Это подвижные кокки, термофильные метилотрофные метаногены, которые не могут расти на ацетате, но используют метанол, метиламин и триметиламин как субстраты для метаногенеза [31].

Филогенетический анализ состава микробного сообщества в обрастаниях титановой пластины, экспонировавшейся на Белом море в условиях освещенности. В образце обрастаний с титановой пластины, экспонировавшейся в прибрежной зоне Белого моря в условиях освещенности, были детектированы 577 видов микроорганизмов, включая некультивируемые и неидентифицированные до уровня вида группы. Качественный состав микробного сообщества оказался довольно схож с таковым из Черного моря (рис. 1).

Наиболее распространенными микроорганизмами в беломорских обрастаниях оказались некультивируемые бактерии рода *Acidithiobacillus* и некультивируемые археи рода *Ferroplasma*, на которых приходилось 7.68 и 7.43% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК соответственно. Это превышало соответствующие показатели по относительной численности представителей порядков *Thermoplasmatales* (рода *Ferroplasma*, *Acidiplasma*) и *Acidithiobacillales* в черноморских обрастаниях в 1.3 и 1.7 раза (рис. 1).

В относительно большом количестве в образце обрастаний титановой пластины из Белого моря были представлены также некультивируемые бактерии семейства *Desulfotomaculales* — 5.50% от всех прочтений последовательностей гена 16S рРНК.

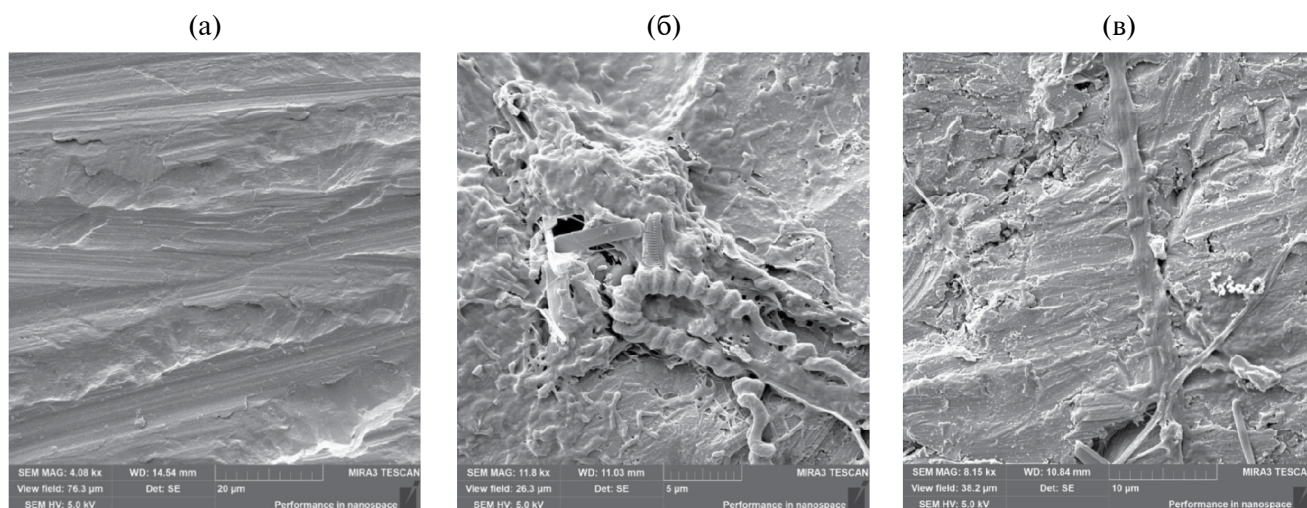


Рис. 2. Обрастания титановых пластин через 10 мес. экспозиции: а — поверхность титана до обрастания; б — титан с биопленкой, Черное море; в — титан с биопленкой, Белое море.

Исходя из анализа данных высокопроизводительного секвенирования, сульфатредуцирующих бактерий из порядка *Desulfotomaculales* в беломорском образце было в 1.23 раза меньше по сравнению с черноморским.

Практически одинаковыми с образцом из Черного моря были относительные численности бактерий рода *Acidiferrobacter* — 5.25% и рода *Acidiphilium* — 2.98%. Некультивируемых бактерий рода *Thermovirga* в беломорских обрастаниях было в 1.3 раза меньше по сравнению с черноморскими — 2.47%, а некультивируемых бактерий рода *Caminicella* меньше в 1.44 раза — 2.23% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК.

Что касается относительной численности метаногенных архей родов *Methanohalophilus* и *Methanlobus* (семейство *Methanosarcinaceae* порядка *Methanosarcinales* класса *Methanosarcinia* филума *Halobacterota*), то она также в образце обрастаний титановой пластины из Белого моря была несколько ниже (в 1.28 раза) по сравнению с черноморским образцом, составляя в целом для порядка *Methanosarcinales* 5.59% от всех прочтений последовательностей гена 16S рНК.

* * *

Таким образом, впервые был изучен полный филогенетический состав микробных сообществ обрастаний титановых пластин, экспонировавшихся в водной толще прибрежной зоны Черного и Белого морей в условиях освещенности.

Сформировавшаяся за время экспозиции биопленка была значительно более мощной в Черном море (рис. 2). Видовое разнообразие микроорганизмов в образцах обрастаний титановых пластин, экспонированных в прибрежной зоне в условиях освещенности, было также выше в Черном

море по сравнению с Белым морем (851 и 577 ОТЕ соответственно).

Особенно важно отметить значительное присутствие в обрастаниях титановых пластин, экспонированных как в Черном, так и в Белом морях, микроорганизмов, обитающих в анаэробных условиях (в частности, сульфатредуцирующих бактерий порядка *Desulfotomaculales*), а также при низких рН (железоокисляющие бактерии родов *Acidiferrobacter* и *Acidithiobacillus*, железоокисляющие археи родов *Ferroplasma* и *Acidiplasma*) и являющихся потенциально важными агентами микробной коррозии за счет образования органических кислот, H_2S и изменения валентности катионов металлов [1, 2–4, 32].

В судостроении титан, благодаря своей высокой коррозионной стойкости, применяется в виде сплавов как конструкционный материал для производства деталей насосов, опреснителей и трубопроводных систем, контактирующих с забортной морской водой, а также при изготовлении подводной обшивки судовых корпусов, проблема обрастания которых весьма актуальна. Кроме того, титан в силу высоких прочностных характеристик практически идеален для создания глубоководных аппаратов.

Полученные в работе данные о филогенетическом составе микробных сообществ в обрастаниях титановых пластин в условиях морей разных климатических зон и о времени развития этих обрастаний могут быть использованы для разработки антикоррозионных средств защиты и установления сроков профилактических обработок корпусов и механизмов судов против биоповреждений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Проведение работы не поддерживалось внешними источниками финансирования и грантами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Enning D., Garrelfs J. // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. № 4. P. 1226–1236. <https://doi.org/10.1128/AEM.02848-13>
2. Tsarovtseva I.M., Bryukhanov A.L., Vlasov D.Y., Maiyorova M.A. // Power Technol. Eng. 2023. V. 57. № 2. P. 203–208. <https://doi.org/10.1007/s10749-023-01643-4>
3. Vlasov D.Y., Bryukhanov A.L., Nyanikova G.G., Zelenskaya M.S., Tsarovtseva I.M., Izatulina A.R. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. № 4. P. 425–437. <https://doi.org/10.1134/S0003683823040166>
4. Emerson D. // Biofouling. 2018. V. 34. № 9. P. 989–1000. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1526281>
5. Zhang Y., Griffin A., Edwards M. // Environ. Sci. Technol. 2008. V. 42. № 12. P. 4280–4284. <https://doi.org/10.1021/es702483d>
6. Magoč T., Salzberg S.L. // Bioinformatics. 2011. V. 27. № 21. P. 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
7. Edgar R.C. // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
8. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
9. Liu H., Meng G., Li W., Gu T., Liu H. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01298>
10. Barton L.L., Hamilton W.A. In: Sulphate-reducing Bacteria: Environmental and Engineered Systems. / Ed. L.L. Barton, W.A. Hamilton. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 533 p.
11. Hallberg K.B., Hedrich S., Johnson D.B. // Extremophiles. 2011. V. 15. № 2. P. 271–279. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0359-2>
12. Williams K.P., Kelly D.P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. № 8. P. 2901–2906. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.049270-0>
13. Jones D.S., Albrecht H.L., Dawson K.S., Schaperdoth I., Freeman K.H., Pi Y., Pearson A., Macalady J.L. // ISME J. 2012. V. 6. № 1. P. 158–170. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.75>
14. Gadd G.M. // Geoderma. 2004. V. 122. № 2–4. P. 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.002>
15. Li X., Kappler U., Jiang G., Bond P.L. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00683>
16. Magnuson T.S., Swenson M.W., Paszczynski A.J., Deobald L.A., Kerk D., Cummings D.E. // Biometals. 2010. V. 23. № 6. P. 1129–1138. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9360-y>
17. Dopson M., Baker-Austin C., Hind A., Bowman J.P., Bond P.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 4. P. 2079–2088. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2079-2088.2004>
18. Golyshina O.V. // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 15. P. 5071–5078. <https://doi.org/10.1128/AEM.00726-11>
19. Zhang L., Wu J., Wang Y., Wan L., Mao F., Zhang W., Chen X., Zhou H. // Hydrometallurgy. 2014. V. 146. P. 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.02.013>
20. Golyshina O.V., Yakimov M.M., Lünsdorf H., Ferrer M., Nimtz M., Timmis K.N., et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. № 11. P. 2815–2823. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009639-0>
21. Ojumu T.V., Petersen J. // Hydrometallurgy. 2011. V. 106. № 1–2. P. 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.11.007>
22. Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S. // Microbes Environ. 2011. V. 26. № 2. P. 101–112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>
23. Alain K., Pignet P., Zbinden M., Quillevere M., Duchiron F., Donval J.P., et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. V. 52. № 5. P. 1621–1628. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1621>
24. Dahle H., Birkeland N.K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. № 7. P. 1539–1545. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63894-0>
25. Yu J., Liberton M., Clifton P.F., Head R.D., Jacobs J.M., Smith R.D., et al. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 8132. <https://doi.org/10.1038/srep08132>
26. Liu X.J., Zhu K.L., Ye Y.Q., Han Z.T., Tan X.Y., Du Z.J., Ye M.Q. // Microb. Genom. 2024. V. 10. № 1. P. 001182. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001182>
27. Simankova M.V., Chernych N.A., Osipov G.A., Zavarzin G.A. // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. № 3. P. 385–389. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80270-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80270-5)
28. Hördt A., López M.G., Meier-Kolthoff J.P., Schleuning M., Weinhold L.M., Tindall B.J., et al. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00468>
29. Doerfert S.N., Reichlen M., Iyer P., Wang M., Ferry J.G. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. № 5. P. 1064–1069. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.003772-0>
30. Shih C.J., Lai M.C. // Can. J. Microbiol. 2010. V. 56. № 4. P. 295–307. <https://doi.org/10.1139/W10-008>

31. Cheng L., Qiu T.L., Yin X.B., Wu X.L., Hu G.Q., Deng Y., Zhang H. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. № 12. P. 2964–2969. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65049-0>
32. Bryukhanov A.L., Vlasov D.Y., Maiorova M.A., Tsarovtseva I.M. // Power Technol. Eng. 2021. V. 54. № 5. P. 609–614. <https://doi.org/10.1007/s10749-020-01260-5>

Phylogenetic Composition of Microbial Communities from Fouling of Titanium Plates in the Coastal Zone of the Black and White Seas

A. L. Bryukhanov^a, A. S. Shutova^b, K. A. Komarova^b, T. A. Semenova^{b, *},
A. A. Semenov^a, and V. A. Karpov^b

^aLomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234 Russia

^bSevertsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia

*e-mail: tashino@mail.ru

With high-throughput sequencing of the variable region V3–V4 of the 16S rRNA gene, the study of the full phylogenetic composition of microbial communities developed on the surface of titanium plates exposed in the water column of the coastal zone of the Black and White Seas was carried out. The presence of potentially corrosive microorganisms from various physiological groups, such as sulfate-reducing bacteria, acidophilic iron-oxidizing bacteria and archaea, sulfur-oxidizing and nitrifying bacteria, was shown in these foulings. In the foulings of titanium plates exposed in the Black Sea, the most common microorganisms were uncultivated sulfate-reducing bacteria of the order *Desulfotomaculales*, which accounted for 8.13% of all 16S rRNA gene sequence reads, as well as acidophilic iron-oxidizing bacteria of the genera *Acidiferrobacter* (5.47%), *Acidithiobacillus* (4.52%) and *Acidiphilium* (2.55%). Acidophilic archaea accounted for up to 7.97% of all reads. In the foulings of titanium plates exposed in the White Sea, the most common were also acidophilic bacteria from the orders *Acidiferrobacterales* and *Acidithiobacillales* (7.68%), as well as acidophilic archaea from the order *Thermoplasmatales* (7.43%). Uncultivated sulfate-reducing bacteria of the order *Desulfotomaculales* were also represented in relatively high numbers (6.61% of all reads).

Keywords: microbial communities, high-throughput sequencing, sulfate-reducing bacteria, acidophilic iron-oxidizing bacteria, titanium, microbiologically influenced corrosion (MIC), Black Sea, White Sea

УДК 581.1:632.938:[633.11:632.4]

УЧАСТИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ОКСИДА АЗОТА В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ С ГЕНОМ *Sr25* ОТ СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЫ

© 2024 г. В. В. Кнауб¹, Л. Я. Плотникова^{1, *}

¹Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,
Омск, 644008 Россия

*e-mail lya.plotnikova@omgau.org

Поступила в редакцию 19.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Роль активных форм кислорода (АФК) и оксида азота NO в защите мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. от ржавчинного гриба *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. and Henn. (*Pgt*) была изучена на примере взаимодействия с устойчивой линией мягкой пшеницы сорта Thatcher с геном *Sr25* от пырея удлиненного *Thinopyrum ponticum* (Tc*Sr25*) и восприимчивым сортом Саратовская 29 (C29). Проростки были обработаны салициловой кислотой (СК) в качестве индуктора АФК, верапамилом ингибитором Ca²⁺-каналов, донором NO нитропруссидом натрия (НП) и поглотителем NO 2-фенил-4,4,5,5-тетраметилимидазол-1-оксил-3-оксидом (с-РТЮ). Для заражения проростков использовали изоляты с реакцией 0 (иммунитет) и 1 (устойчивость с проявлением реакции сверхчувствительности, СВЧ). NO стимулировал ориентацию ростковых трубок и образование аппрессориев *Pgt* на поверхности устойчивых растений, а в восприимчивых усиливал рост колоний при обработке растений за 1 сут или одновременно с инокуляцией. Генерация супероксид-аниона была основной причиной гибели аппрессориев *Pgt* на устьицах устойчивых растений, а NO не влиял на проникновение в ткани. АФК индуцировали реакцию СВЧ и ускоряли разрушение цитоплазмы клеток, а NO способствовал расширению зоны некроза в устойчивых растениях.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Sr25*, активные формы кислорода, оксид азота, прегаусториальная устойчивость, реакция СВЧ

DOI: 10.31857/S0555109924060055 EDN: QGCDXJ

Мягкая пшеница *Triticum aestivum* L. — один из трех основных злаков, обеспечивающих питанием население мира, при этом ее посевы подвергаются постоянному воздействию патогенных микроорганизмов. Среди возбудителей болезней наиболее опасными признаны ржавчинные грибы, что связано с их быстрой эволюцией, высокими потерями урожая во время эпифитотий и способностью к трансграничному/трансконтинентальному переносу спор [1]. Пшеницу поражают три ржавчинные болезни: стеблевая, желтая и бурая, вызываемые биотрофными грибами *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. and Henn. (*Pgt*), *P. striiformis* Westend f. sp. *tritici* Erikss. и *P. triticina* Erikss. соответственно. Вредоносность стеблевой и желтой ржавчины в мире резко усилилась с 2000 гг., что связано с появлением новых рас и распространением их в странах Африки, Ближнего Востока, Европы и в России [2–5].

Для защиты пшеницы от быстро эволюционирующих биотрофных патогенов актуально изучение

регуляции иммунной системы растений, а также выявление механизмов, контролируемых эффективными генами устойчивости. В 1990 гг. было установлено, что после узнавания метаболитов патогена рецепторами растений развивается комплекс быстрых реакций, включая потоки ионов Ca²⁺ через плазматическую мембрану, образование АФК, активацию МАРК-киназ (митоген-активируемых протеинкиназ) [6]. АФК (супероксид-анион O₂^{•−}, пероксид водорода H₂O₂ и др.) играют роль мессенджеров в НАДФН-оксидазной сигнальной системе, реализующейся через СК-зависимый каскад. Кроме того, они могут разрушать клетки патогенов, участвовать в реализации реакции сверхчувствительности (СВЧ) и лигнификации клеточных стенок [7]. В эти же годы было установлено, что оксид азота NO является одним из ключевых молекул-трансмисмиттеров, регулирующих процессы у разных организмов [8]. В результате различных реакций в растениях образуется набор активных форм азота (АФА): оксид азота NO, нитроксильный анион NO[−], пероксинитрит

ONOO⁻, S-нитрозотиолы и др. [9]. Показано влияние NO на активацию ферментов первичного метаболизма, клеточного цикла и физиологические процессы растений: прорастание семян, развитие корневой системы, рост побегов, водный обмен, фотосинтез и др. [10–12]. Регуляция метаболизма растений с помощью АФА осуществляется за счет модуляции генетических программ и посттрансляционных модификаций белков [9, 13]. Наибольшее внимание было уделено изучению роли NO в защите от абиотических стрессов: засухи, экстремальных температур, засоления, гипоксии и т.д. [11, 14–16].

Участие АФА в защите растений от болезней изучено в меньшей степени. При этом отмечено участие NO в защите видов-нехозяев и расоспецифической устойчивости хозяев, контролируемых системами РТИ и ЕТИ соответственно [17–19]. Большая часть сведений об участии NO в защите растений от болезней была получена на примере культур клеток, обработанных элиситорами, а также модельных видов, инфицированных вирусами, бактериями и некротрофными патогенами [11, 20]. Исследованию роли NO во взаимодействиях ржавчинных грибов с видами растений были посвящены единичные исследования. На примере растений нехозяина *Arabidopsis thaliana*, инфицированных урединиоспорами *P. tritici*, было установлено повышение уровня NO после остановки развития патогена [18]. Влияние АФК и NO на взаимодействие с устойчивыми сортами было изучено на примере пшеницы, инфицированной *P. striiformis* f. sp. *tritici* или *P. tritici*, а также овса, зараженного *P. coronata*. При этом были сделаны различные выводы о значении соединений в защите растений: NO — основная причина реакции СВЧ [21]; для отмирания клеток необходимы АФК и NO [18, 22, 23]; NO обеспечивает передачу сигнала о начале СВЧ между клетками [17].

Для понимания механизмов длительной устойчивости пшеницы к *Pgt* актуально изучение роли АФК и NO в проявлении эффективных в различных регионах мира *Sr* генов. В связи с этим представляет интерес исследование взаимодействия *Pgt* с пшеницей, несущей *Sr* гены от пырея удлиненного *Thinopyrum ponticum* Podpěra, (1902) Z.-W. Liu & R.-C. Wang, 1993, эффективные против стеблевой ржавчины во многих регионах мира [4, 24].

Целью исследований было изучение роли АФК и NO в защите мягкой пшеницы с геном пырея удлиненного *Sr25* от возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы.

МЕТОДИКА

Растительный материал. В качестве объектов исследований были использованы 10-суточные проростки почти изогенной линии сорта яровой мягкой пшеницы Thatcher (RL6040), несущей

транслокацию 7DS-7DL-7Ae#1L со сцепленными генами устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине *Lr19/Sr25* (TcSr25) от пырея удлиненного *Thinopyrum ponticum* [25], а также восприимчивого сорта Саратовская 29 (С29). Растения выращивали в сосудах с почвой при температуре 20–24°C (ночь/день), при 16-часовом освещении лампами Osram L 36W/77 с интенсивностью 146 Вт/м².

Подготовка инокулюма и инфицирование растений. Для заражения растений использовали урединиоспоры моноспоровых изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, выделенных из западносибирской популяции (зоны г. Омска). Изоляты были размножены на проростках восприимчивого сорта С29. Инфицирование проводили путем опрыскивания суспензией урединиоспор *Pgt*, приготовленной в растворе детергента Твина-80 из расчета 10–12 тыс. спор/мл. Инфекционный тип (ИТ) на заражение определяли по модифицированной шкале Stackman [26]: 0 — без симптомов; ; — мелкие некротические пятна; 1 — мелкие пустулы, окруженные некротическими зонами; 2 — мелкие пустулы, окруженные большими некротическими пятнами; 2 — средние пустулы, окруженные хлоротическими зонами; 3+ — крупные пустулы с зонами хлороза; 4 — крупные пустулы. ИТ 0–2 определяли как устойчивый, а 3–4 — восприимчивый. Для экспериментов были использованы два авирулентных к гену *Sr25* изолята *Pgt*: первый — с характерным для популяции ИТ 0, второй — редкий изолят с ИТ 1.

Индукция и подавление генерации АФК и NO. Для изучения влияния АФК и NO на патогенез растения были обработаны фармакологическими препаратами. Генерацию АФК индуцировали с помощью 0.01%-ного (0.63 мМ) водного раствора салициловой кислоты (СК, “Sigma-Aldrich”, США) [27]. Для подавления образования АФК применяли 0.01%-ный (0.36 мМ) водный раствор ингибитора Ca²⁺-каналов верапамила (“Sigma-Aldrich”, США) [28]. Образование NO обеспечивали путем обработки 0.15 мМ раствором донора NO нитропруссидом натрия (НП, “MP Biomedicals”, USA) [29]. Для снижения содержания NO применяли 1 мМ раствор поглотителя NO (скавенджера) **c-PTIO** (2-phenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide, “Sigma-Aldrich”, США) [30]. Раствор СК наносили путем опрыскивания (1 мл/10 растений), а для введения остальных препаратов концы срезанных листьев помещали в кюветы с растворами на 24 ч. Затем листья инкубировали на фильтровальной бумаге, смоченной 0.005 %-ным раствором бензимидазола (“Sigma-Aldrich”, США) [31]. Для определения влияния АФК и NO на ключевые ранние стадии взаимодействия обработку проростков всеми реактивами проводили в три срока, начиная: 1) за 24 ч до инокуляции; 2) одновременно с инокуляцией; 3) через 24 ч после инокуляции (п/ин). Во втором варианте листья опрыскивали

раствором СК за 5 мин до инокуляции, а после подсыхания листьев наносили суспензию урединоспора. В качестве контроля использовали инфицированные растения, не обработанные препаратами.

Определение содержания АФК и NO. Содержание O_2^- определяли акцепторным методом по превращению адреналина в адренохром при $\lambda = 490$ нм с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия) [32]. Пероксид водорода определяли с помощью ксиленолового оранжевого при $\lambda = 560$ нм [33].

Содержание NO в тканях измеряли с помощью реакции Грисса при длине волны $\lambda = 527$ нм [34]. Концентрацию O_2^- , H_2O_2 и NO рассчитывали в мкмоль/г сырой массы листьев. Анализы проводили через 12, 24, 48, 72, 120 и 240 ч п/ин, в двух биологических (по 10 отрезков листьев) и трех аналитических повторностях. На графиках приведены средние значения и стандартные ошибки.

Локализация АФК в тканях и цитологические исследования. Присутствие O_2^- и H_2O_2 в тканях определяли путем витального окрашивания листьев 0.1%-ным нитросиним тетразолием (НСТ, “Acros”, США) или 0.02%-ным 3,3'-диаминобензидин тетрахлоридом (ДАБ, “Sigma-Aldrich”, США), при этом образовывались нерастворимые синий или вишневый формазаны соответственно [35]. Растворы вводили в листья с помощью вакуум-инфильтрации и инкубировали в течение 30 мин. После окрашивания материал фиксировали в лактофеноле (фенол, молочная кислота, глицерин, дистиллированная вода, этиловый спирт в соотношении 1 : 1 : 1 : 1 : 8). Развитие инфекционных структур гриба изучали на фиксированных листьях, предварительно окрашенных с помощью НСТ или ДАБ. Кусочки листьев окрашивали 1%-ным анилиновым синим (“Sigma-Aldrich”, США) в лактофеноле, затем дифференцировали окраску насыщенным водным раствором хлоралгидрата (“Acros”, США) [36]. В результате структуры гриба окрашивались в синий цвет, неповрежденные клетки растений – в светло-голубой, отмершие в результате реакции СВЧ – в темно-синий. Степень разрушения клеток дополнительно контролировали по автофлуоресценции окисленных фенолов в цитоплазме в отраженном свете с волной возбуждения $\lambda_{\max} = 355$ нм и свечения $\lambda_{\max} = 420$ нм. При интенсивном разрушении цитоплазмы в результате реакции СВЧ клетки имели яркую зеленую автофлуоресценцию [36]. Цитологические исследования проводили с помощью светового микроскопа ARSTEK E62 (“ARSTEK”, Китай) с цифровой камерой Sony Alpha A6400 APS-C с разрешением 24.2 МП/дюйм (“Sony”, Япония).

Для цитологических исследований использовали по пять растений С29 и Тс.Ст25. При всех сроках наблюдений учитывали результаты развития 30–40 инфекционных единиц, при этом определяли

доли (%): проросших спор, ростковых трубок с аппрессориями, аппрессориев на устьицах от их общего количества, аппрессориев, образовавших подустычные везикулы (ПВ), площадь колоний (мкм²). Размеры колоний (мкм) измеряли окуляр-микрометром, их площадь рассчитывали по формуле площади эллипса. Для анализа результатов развития инфекционных структур на поверхности растений был проведен однофакторный дисперсионный анализ и была рассчитана наименьшая существенная разность при $p \leq 0.05$ (НСР_{0.05}) [37]. По остальным данным рассчитывали средние значения и стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты визуальной оценки влияния фармакологических препаратов. На контрольных растениях восприимчивого сорта С29 изоляты *Pgt* развивались успешно, и через 240 ч п/ин формировали крупные пустулы (ИТ 4) (табл. 1). Обработка СК приводила к небольшому уменьшению размеров пустул и появлению вокруг них зон хлороза (ИТ 3+), остальные реактивы не оказали влияния на ИТ. На контрольных растениях Тс.Ст25, инфицированных изолятом *Pgt1*, признаков заражения не отмечено (ИТ 0), а при использовании изолята *Pgt2* образовывались мелкие пустулы, окруженные зоной некроза (ИТ 1). После обработки СК на устойчивых растениях, зараженных изолятами *Pgt1* и *Pgt2*, проявлялись только мелкие некротические пятна (ИТ ;). Применение НП, одновременно с инокуляцией *Pgt1* приводило к появлению на листьях микроскопических некрозов, а в комбинации с *Pgt2* – к расширению зоны некроза вокруг пустул (ИТ 2). Обработка растений верапамилем за 24 ч и одновременно с инокуляцией, а также с-РТИО одновременно с инокуляцией, снизило интенсивность отмирания тканей вокруг пустул (ИТ 2). В остальных вариантах опыта ИТ растений Тс.Ст25 не изменялся. Эти результаты свидетельствуют о физиологическом воздействии АФК и АФА на взаимодействие пшеницы с *Pgt*.

Влияние препаратов на содержание АФК и NO в растениях. Исследование динамики накопления O_2^- показало, что в инфицированных растениях колебания происходили в течение первых 48 ч п/ин, а дальше его уровень стабилизировался (приведены данные за период 0–48 ч п/ин). В контрольных инфицированных растениях восприимчивого сорта С29 содержание O_2^- колебалось в пределах 1.3–1.6 мкмоль/г сырой массы (рис. 1а). В контрольных устойчивых растениях линии Тс.Ст25 через 12 ч п/ин отмечено повышение уровня супероксид-аниона в 1.3–1.5 раза по сравнению с контролем, сильнее выраженное в комбинации с *Pgt1* (ИТ 0), а через 24 ч п/ин содержание O_2^- падало (рис. 1).

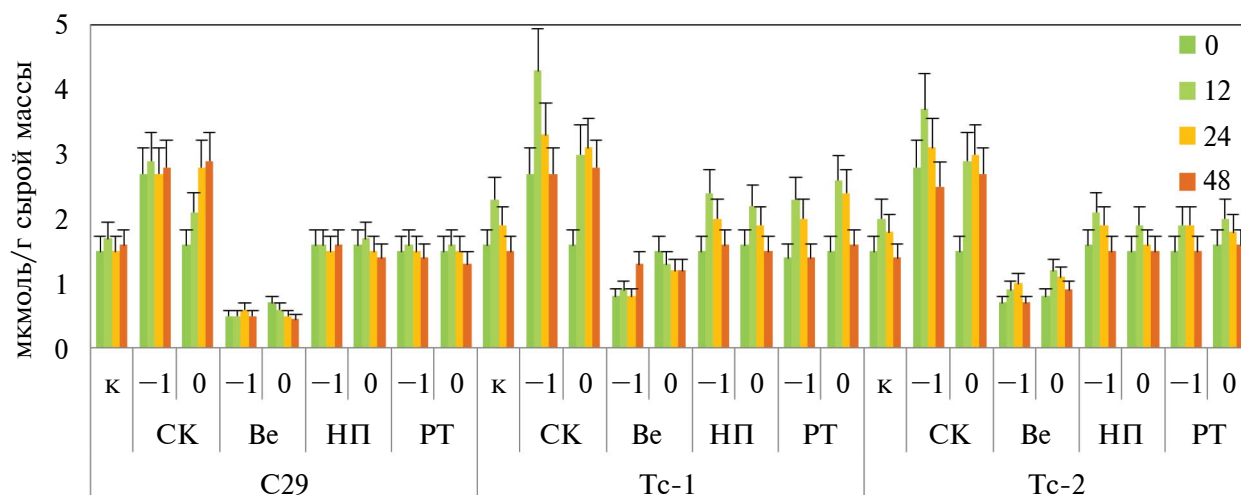


Рис. 1. Динамика изменения содержания супероксид-аниона $O_2^{\cdot-}$ в инфицированных *P. graminis* f. sp. *tritici* растениях восприимчивого сорта пшеницы и устойчивой линии при обработке фармакологическими препаратами: С-29 – Саратовская 29; Тс-1 и Тс-2 – линия ТсSr25, инфицированная изолятами *Pgt1* и *Pgt2*, соответственно; Ве – верапамил; НП – нитропруссид натрия; РТ – с-РТЮ; СК – салициловая кислота; –1, 0 и 1 – обработка растений препаратами за 24 ч, одновременно и через 24 ч п/ин. 0, 12, 24, 48 – время после инокуляции (ч).

Применение СК привело к повышению уровня $O_2^{\cdot-}$ до инфицирования растений во всех комбинациях в 1.7–1.9 раз. В восприимчивых растениях уровень позже значительно не изменялся. Обработка СК устойчивых растений приводила к значительному повышению содержания $O_2^{\cdot-}$ через 12 ч п/ин, а через 48 ч п/ин оно снижалось до уровня контроля. Ингибитор Ca^{2+} -каналов верапамил обеспечивал 2–3-кратное снижению содержания супероксид-аниона во всех комбинациях. Донор NO НП и скарвенджер с-РТЮ не вызывали достоверных изменений содержания $O_2^{\cdot-}$ в растениях.

Изучение динамики образования пероксида водорода показало, что в контрольных инфицированных растениях сорта С29 его уровень повышался к моменту спорогенеза через 240 ч п/ин (в 1.2 раза по отношению к исходному уровню) (рис. 2а). Предобработка растений С29 СК за 24 ч до инокуляции стимулировала повышение содержания H_2O_2 в 1.3–1.6 раза через 72–240 ч п/ин. При более поздних сроках применения СК эффект проявлялся позже, но максимальные уровни H_2O_2 в вариантах достоверно не отличались. Инфильтрация тканей верапамилем приводила к 1.6–2.1-кратному снижению уровня H_2O_2 к контролю через 0–72 ч п/ин во всех вариантах опыта. Позже влияние верапамила ослабевало, и к концу эксперимента содержание H_2O_2 в восприимчивых растениях было близким к контролю. Обработка восприимчивых растений НП и с-РТЮ существенно не влияла на содержание H_2O_2 .

В контрольных устойчивых растениях линии ТсSr25 при инфицировании *Pgt1* значительное усиление накопления H_2O_2 началось через 48 ч п/ин, и повышалось до конца опыта (в 3.9 раза к исходному

уровню) (рис. 2в). В комбинации с изолятом *Pgt2* резкое усиление генерации H_2O_2 начиналось через 72 ч п/ин и к концу эксперимента было выше исходного в 4.5 раза (рис. 2д). Применение СК на линии ТсSr25 приводило к 1.5-кратному увеличению накопления H_2O_2 к контролю через 24 ч после начала обработок во всех вариантах опыта.

В комбинации с изолятом *Pgt1* при предобработке СК за 24 ч до инокуляции отмечено усиление накопления H_2O_2 уже через 24 ч п/ин и через 120 ч п/ин его содержание выше контрольного в 1.4 раза, а затем снижалось. Сходный уровень и динамика образования H_2O_2 наблюдались при более поздних обработках растений. В комбинации с изолятом *Pgt2* предобработка СК индуцировала значительное усиление образования H_2O_2 через 48 ч, и прогрессирующий рост через 72–240 ч п/ин. При обработке СК одновременно и через 24 ч после инокуляции динамика синтеза пероксида водорода была сходной, но максимальный уровень был ниже. Ранее сходное усиление генерации H_2O_2 было отмечено при предобработке СК растений пшеницы, инфицированной *P. triticea* [27].

Обработка верапамилем приводила к 1.5–1.8-кратному подавлению образования H_2O_2 к контролю. Через 120 ч после окончания обработки влияние верапамила частично нивелировалось, и уровень H_2O_2 возрастал. После инфильтрации НП устойчивых растений, зараженных изолятами *Pgt1* и *Pgt2*, усиление накопления H_2O_2 происходило через 48 ч после прекращения обработки, но максимальный уровень пероксида водорода был ниже, чем в вариантах с СК. Стимулирующее влияние НП на образование H_2O_2 было наиболее выражено в комбинации с изолятом *Pgt2*. Обработка с-РТЮ

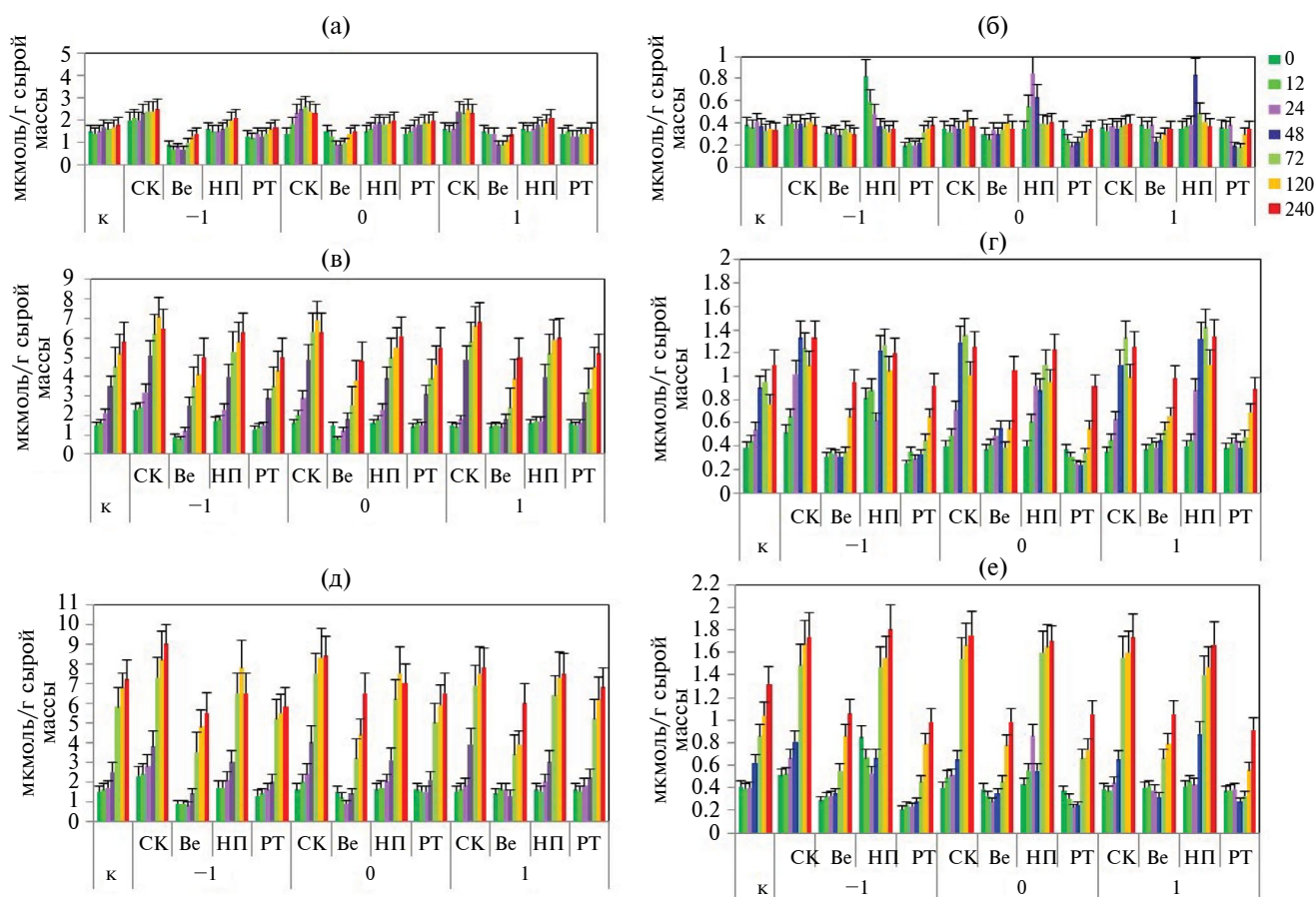


Рис. 2. Динамика накопления пероксида водорода H_2O_2 (а, в, д) и оксида азота NO (б, г, е) в тканях сорта Саратовская 29 (а, б) и линии TcSr25 при инфицировании изолятами *Pgt1* (в, г) и *Pgt2* (д, е): CK – салициловая кислота; Be – верапамил; HP – нитропруссид; PT – с-РТЮ; -1, 0 и 1 – обработка растений препаратами за 24 ч, одновременно и через 24 ч п/ин. 0, 12, 24, 48, 72, 120, 240 – время после инокуляции, ч.

приводила к достоверному умеренному снижению уровня H_2O_2 через 48–240 ч п/ин при взаимодействии с двумя изолятами *Pgt*.

Исследования уровня NO в контрольных инфицированных растениях сорта С29 показало, что его содержание в тканях было стабильным в течение 0–48 ч п/ин, а позже слабо снижался (–10% к исходному уровню) (рис. 2б). Обработка СК приводила к повышению уровня NO в 1.2–1.3 раза, но значительно не влияла на содержание NO. В тоже время, обработка верапамилем слабо снижала уровень NO (в 1.2 раза), за исключением падения NO через 48 ч п/ин. Инфильтрация тканей инфицированных восприимчивых растений раствором HP вызывала увеличение содержания NO в 1.5–2.1 раза через 12–24 ч после начала обработки, через 12 ч уменьшалось (в 1.3 раза), а через 24 ч возвращалось к исходному уровню (рис. 2б). Обработка растений скавенджером NO с-РТЮ приводила к 1.6–2-кратному снижению уровня NO в течение 72 ч после обработки, а позже уровень вещества увеличивался, но не достигал исходного уровня. Относительно

кратковременный эффект HP как донора NO описывался ранее [38].

При взаимодействии линии TcSr25 с изолятом *Pgt1* накопление NO имело двухфазный характер с пиками через 48–72 и 240 ч п/ин (рис. 2г), а с изолятом *Pgt2* – однофазный с пиком через 240 ч/ин (рис. 2е). Предобработка с помощью СК привела к усилению образования NO через 24 ч после окончания обработки во всех вариантах (в 1.3–1.5 раза выше контроля). При всех сроках применения СК в комбинации с *Pgt1* сохранялась двухфазный, а в комбинации с *Pgt2* – однофазный характер накопления NO.

Обработка HP инфицированных устойчивых растений линий TcSr25 приводила к появлению пика накопления NO через 24 ч после начала инфильтрации препаратом. Динамика образования NO зависела от сроков применения HP. В комбинации с изолятом *Pgt1* отмечен пик образования NO через 0–12 ч п/ин и повторное усиление генерации NO через 48–240 ч п/ин. При более позднем применении HP усиление накопления оксида азота происходило через 24–240 ч п/ин, с падением

через 120 ч п/ин. Индуцирующее влияние СК и НП на максимальное образование NO было сходным. Обработка растений скавенджером NO с-PTIO приводила к более значительному снижению содержания NO, чем ингибитором Ca^{2+} -каналов верапамилом, но через 120–240 ч п/ин действие препаратов снижалось.

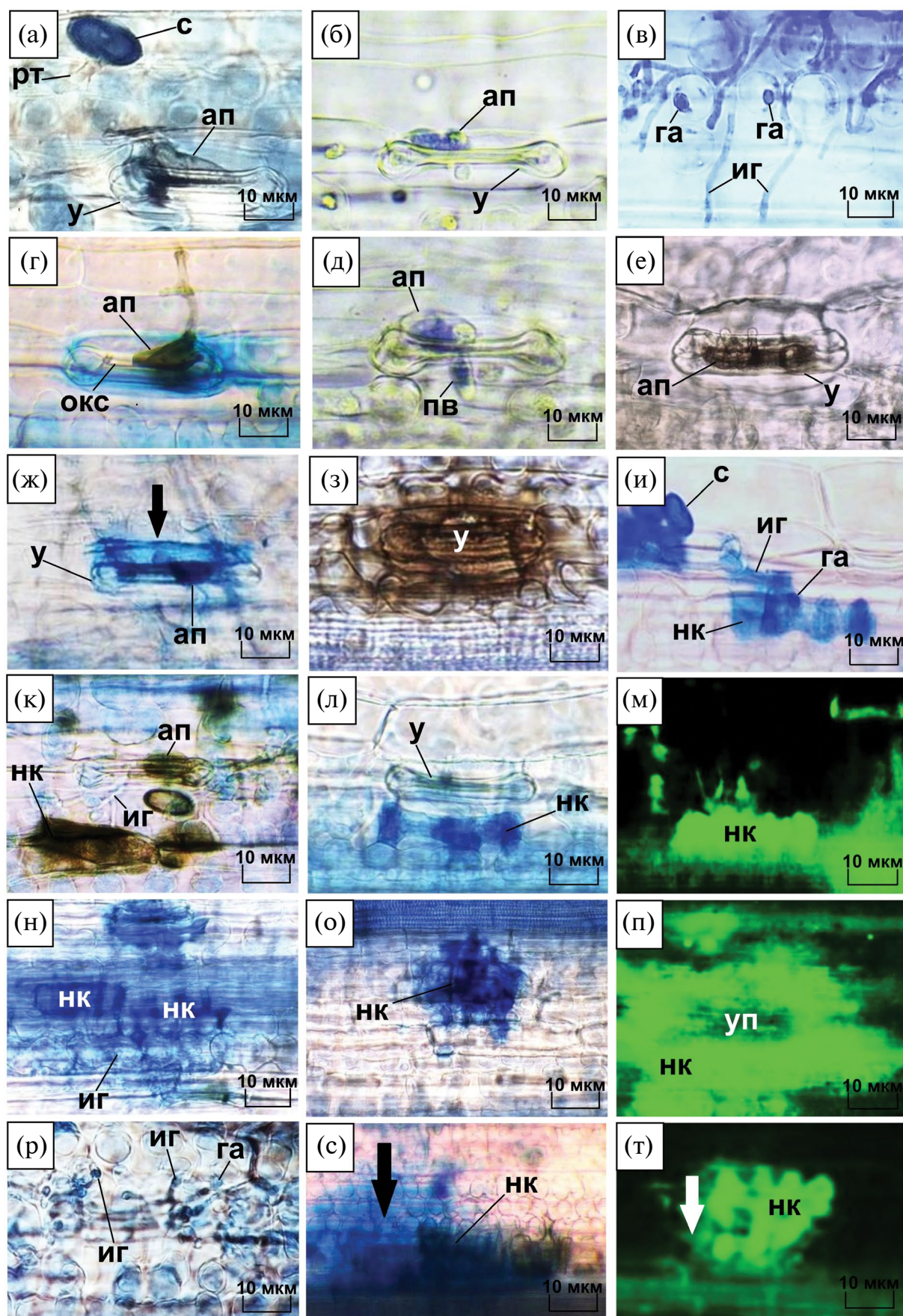
Ранее на примере взаимодействия *Triticum aestivum* с *P. striiformis* f. sp. *tritici* и томатов с возбудителем мучнистой росы *Oidium neolycopersici* также было выявлено двухфазное накопление NO в устойчивых комбинациях [21, 39]. При этом повышение уровня NO в томатах объясняли развитием системной приобретенной устойчивости (SAR), что было подтверждено анализом экспрессии генов PR-белков [39]. При изучении реакций зараженного *P. coronata* устойчивого сорта овса установлено взаимное подавление генерации АФК и NO при повышении уровня одного из них [22]. Однако, в настоящих экспериментах таких закономерностей не было установлено.

Ранее в ходе изучения регуляторной роли АФК и NO в защите растений были применены различные методы (использование флуоресцентных зондов, биохимические исследования и др.), разнообразные модели, а также наборы фармакологических препаратов (индукторов, ингибиторов и скавенджеров NO и АФК) с широким спектром концентраций. В частности, НП использовали в концентрации от 0.1 мкМ до 2.5 мМ [11, 12, 20]. Различные методические подходы значительно затрудняют сравнение и интерпретацию исследований. Установлено, что эффекты АФК и АФА зависят от их концентраций в тканях [12]. Максимальное содержание NO в тканях *A. thaliana* образовывалось после обработки НП в концентрации 20 мкМ, а реакция СВЧ сильнее проявлялась при 0.5 мкМ [40]. При высоких концентрациях NO и АФК в тканях может образовываться токсичный пероксинитрит ONOO^- , оказывающий антимикробное действие [41], а при низких возможна индукция SAR через СК-зависимый каскад [42]. После искусственного повышения уровня АФК и NO может изменяться естественное протекание защитных реакций за счет модификации структуры белков, участвующих во взаимодействиях [10, 12].

В последние годы в практике растениеводства стали применять доноры NO для стимуляции физиологических процессов и устойчивости к абиотическим стрессам, при этом используют низкие или умеренные концентрации препаратов (например, НП в концентрации 0.2–0.5 мкМ) [11]. В настоящих экспериментах были использованы растворы СК и НП в концентрациях, способствующих образованию O_2^- , H_2O_2 и NO в количествах, сравнимых с контролем. Вероятно, такие воздействия создавали близкие к возникающим в естественных патосистемах соотношения АФК и NO.

Цитологические особенности взаимодействия патогена с растениями при индукции или подавления генерации АФК и NO. После попадания инокулюма *Pgt* на поверхность растений восприимчивого сорта происходило набухание урединиоспор. Затем образовывались ростковые трубки, большая часть которых (80.3%) направлялись к устьицам и образовывали на них аппрессории через 12 ч п/ин (максимально через 12 ч п/ин), обеспечивающие проникновение в ткани (рис. 3а). На сорте С29 38% ростковых трубок формировали аппрессории, из них 45% обеспечивали проникновение в ткани, и на устьицах оставались пустые клеточные оболочки (рис. 3а). В остальных случаях аппрессории прекращали развитие на устьицах (рис. 3б). Через 48 ч п/ин остановившиеся на устьицах аппрессории погибали, и в их цитоплазме накапливалась H_2O_2 , а на клеточных стенках контактирующих с ними, появлялись отложения (рис. 3г). После проникновения в устьица грибок образовывал ПВ, а затем инфекционные гифы и гаустории в мезофилльных клетках (рис. 3в, д). Колонии динамично развивались и образовывали урединиопустулы со спорами через 240 ч п/ин. Достоверного влияния фармакологических препаратов на ориентацию ростковых трубок к устьицам, интенсивность образования аппрессориев и проникновение в устьица сорта С29 не выявлено (табл. 1). Значительных цитологических изменений клеток в зоне колоний в контрольных и обработанных фармакологическими препаратами растений не обнаружено.

Для изучения комплексной роли АФК и NO в защите мягкой пшеницы от *Pgt* была использована линия пшеницы с транслокацией от *T. ponticum*, предотвращающая проникновение в устьица и мезофилльные клетки [24, 36]. Такой эффект считается характерным для видов-нехозяев и был назван “прегаусториальной устойчивостью” для патогенных грибов [43] или “устьичным иммунитетом” для бактерий [44]. Аналогичное действие оказывает ген *Sr31* ржи *S. cereale*, защищавший пшеницу во всем мире в течение нескольких десятилетий [45]. В экспериментах были использованы два изолята, из них один взаимодействовал с линией как с нехозяином, а второй — как с хозяином с проявлением реакции СВЧ. При постановке экспериментов было учтено, что характер взаимодействия между пшеницей и ржавчинными грибами определяется уже в течение первых 2–3 сут п/ин, когда образуется необходимый для взаимодействия с растениями набор инфекционных структур и происходит внедрение питающих патогена гаусторий в клетки хозяина [46]. Обработка фармакологическими препаратами была проведена в три срока, чтобы обеспечить их воздействие на развитие *Pgt* на поверхности растений, при внедрении в устьица и начале взаимодействия с мезофилльными клетками.



На устойчивой линии TcSr25 изоляты *Pgt1* и *Pgt2* образовывали меньше аппрессориев, по сравнению с сортом С29 (26.4 и 30.2% соответственно), и обработка препаратами не влияла на интенсивность их формирования. Однако на растениях, обработанных НП за 24 ч и одновременно с инокуляцией, достоверно увеличивалась доля аппрессориев на устьицах, что свидетельствовало об улучшении ориентации ростковых трубок к ним (табл. 1). Оценка результатов развития *Pgt* через 240 ч п/ин показала, что обработка восприимчивых растений НП за 24 ч и одновременно с инокуляцией приводила к достоверному увеличению площади колоний, а обработка с-РТЮ оказывала противоположное действие на развитие патогена (рис. 4). Площадь колоний патогена в восприимчивых растениях после применения СК и верапамила снижалась на 12–18%.

Ранее при изучении роли NO основное внимание было уделено его роли в защите реакций от абиотических и биотических факторов. В настоящих исследованиях впервые было показано, что повышенный уровень NO во время развития гриба на поверхности растений может улучшать взаимодействие авирулентных изолятов с устойчивыми растениями. При развитии *Pgt* на восприимчивом сорте С29 повышенный уровень NO на первых этапах взаимодействия создавал пролонгированный эффект и обеспечивал формирование колоний большего размера, чем в контроле. Ранее была продемонстрирована регулирующая роль NO в муталистических ассоциациях эндифитных грибов с растениями, а также формировании симбиотической микоризы [47, 48]. Эти факты подтверждают универсальную роль NO в регуляции жизнедеятельности организмов.

На линии TcSr25 в цитоплазме значительной части аппрессориев и подустыичных везикул (ПВ) было установлено накопление O_2^- в местах

контакта с замыкающими клетками устьиц, более выраженное при взаимодействии с изолятом *Pgt1* (рис. 3д). Генерация O_2^- замыкающими клетками устьиц объясняет повышение его уровня через 12 ч п/ин, выявленное биохимическим методом (рис. 1). Позже в аппрессориях и ПВ накапливался H_2O_2 , их цитоплазма интенсивно окрашивалась, что характерно для разрушенных клеток (рис. 3е). На растениях, обработанных СК за 24 ч и одновременно с инокуляцией, значительно повысилась доля погибших на устьицах аппрессориев (табл. 1), а также ускорилось разрушение их цитоплазмы. Цитоплазма контактирующих с ними замыкающих клеток устьиц окрашивалась, что указывает на ее повреждение (рис. 3ж). Эти явления совпадали с повышением уровня O_2^- и H_2O_2 в тканях (рис. 1, 2в, д). Через 24–48 ч в цитоплазме поврежденных замыкающих клеток устьиц и клеток в подустыичной полости накапливался H_2O_2 (рис. 3з), что объясняет значительное повышение его уровня (рис. 2в). Обработка верапамилем устраняла накопление O_2^- и значительно снижала долю погибших на устьицах аппрессориев, а НП и с-РТЮ не влияли на проникновение *Pgt* в устьица (табл. 1).

Изолят *Pgt1* после проникновения в устьица линии TcSr25 преимущественно (75% случаев) прекращал развитие на стадиях ПВ или первой инфекционной гифы. В остальных случаях формировались мелкие колонии с 1–3 гаусториями, внедрение которых приводило к развитию реакции СВЧ через 24–48 ч п/ин (рис. 3и). В растениях с индуцированной СК генерацией АФК изолят *Pgt1* прекращал развитие преимущественно на стадиях аппрессория, ПВ или инфекционной гифы. В редких случаях образовывалась гаустория в клетке. В таких клетках уже через 24 ч п/ин накапливался H_2O_2 , их цитоплазма быстро разрушалась в ходе интенсивной реакции СВЧ (рис. 3к, л). Через 3 сут п/ин цитоплазма

Рис. 3. Результаты влияния индукторов генерации АФК и NO на развитие *Pgt* на восприимчивом сорте Саратовская 29 (С29) (а, в, д) и устойчивой линии TcSr25 (б, г, е–т): а – пустой аппрессорий на устьице, б – аппрессорий на устьице с окрашенными митохондриями, в – колония с инфекционными гифами и гаусториями в мезофильных клетках, г – накопление H_2O_2 в цитоплазме отмершего аппрессория и появление отложений на стенках замыкающих клеток устьица, д – накопление O_2^- в цитоплазме аппрессория и ПВ на устойчивом растении, е – накопление H_2O_2 в аппрессории и ПВ, ж – повреждение цитоплазмы замыкающих клеток устьиц (стрелка), з – накопление H_2O_2 в цитоплазме замыкающих клеток устьиц и примыкающих клеток, и – начальный этап гибели клетки растения в результате реакции СВЧ после внедрения гаустории, к – накопление H_2O_2 в аппрессории и клетке, отмершей после внедрения гаустории, л – усиление окраски цитоплазмы клетки, погибшей в результате реакции СВЧ после обработки СК, м – автофлуоресценция цитоплазмы клетки, отмершей в результате реакции СВЧ после обработки СК, н – клетки растения с усиленной окраской и погибшие в результате реакции СВЧ, о – интенсивная реакция СВЧ в зоне колонии в устойчивой линии после обработки СК, п – автофлуоресценция отмерших клеток в зоне пустулы, р – образование инфекционных структур после обработки верапамилем, с – некротические клетки, погибшие в результате реакции СВЧ и зона коллапсированных клеток с усиленной окраской цитоплазмы (стрелка) после обработки НП, т – интенсивная автофлуоресценция клетки с разрушенной в ходе СВЧ цитоплазмой (стрелка) и слабая автофлуоресценция коллапсированных клеток рядом. Окраска: а, в, ж, и, л, н, о, р – анилиновый синий; б, д – НСТ; г, к, с – анилиновый синий + ДАБ; е, з – ДАБ; м, п, т – автофлуоресценция. Обозначения: ап – аппрессорий, га – гаустория, иг – инфекционная гифа, нк – некротическая клетка растения, окс – отложения на клеточной стенке, пв – подустыичная везикула, рт – ростковая трубка, с – спора, у – устьице, уп – урединиопустула.

Таблица 1. Влияние обработки фармакологическими препаратами на реакции пшеницы и развитие инфекционных структур *Pgt* на поверхности растений

Комбинация	Вариант опыта**	ИТ	Доля аппрессориев, %		
			от числа проросших спор	на устьицах от их общего числа	отмерших на устьицах
C29- <i>Pgt2</i>	Контроль	4	3.2	80.3	55.3
	СК –24 ч	3+	42.1	78.8	61.2
	СК 0 ч	3+	39.4	83.2	55.4
	Верапамил –24 ч	4	43.5	85.1	53.6
	Верапамил 0 ч	4	40.3	80.9	54.7
	НП –24 ч	4	36.2	76.5	58.5
	НП 0 ч	4	39.4	83.4	52.2
	с-РТЮ –24 ч	4	40.1	82.6	56.1
	с-РТЮ 0 ч	4	37.1	85.1	50.9
TcSr25- <i>Pgt1</i>	Контроль	0	26.5	83.3	67.2
	СК –24 ч	;	24.2	89.3	92.2*
	СК 0 ч	;	27.3	83.4	87.5*
	Верапамил –24 ч	0	28.0	78.2	45.3*
	Верапамил 0 ч	0	27.2	87.3	53.4*
	НП –24 ч	0	28.7	95.3*	73.6
	НП 0 ч	;	25.1	100.0*	65.5
	с-РТЮ -24 ч	0	24.2	86.2	69.0
	с-РТЮ 0 ч	0	26.4	82.5	65.2
TcSr25- <i>Pgt2</i>	Контроль	1	32.8	91.3	66.3
	СК –24 ч	;	36.1	92.5	88.6*
	СК 0 ч	;	29.5	87.4	90.2*
	Верапамил –24 ч	2	33.6	91.2	61.4
	Верапамил 0 ч	2	29.4	89.0	58.2*
	НП –24 ч	1	35.0	100.0*	62.3*
	НП 0 ч	2–	31.7	100.0*	62.5
	с-РТЮ –24 ч	1	34.5	92.5	65.6
	с-РТЮ 0 ч	2	32.9	90.4	68.2
	НСР _{0.05}	–	4.5	6.5	5.6

* Достоверно при $p \leq 0.05$. ** Время обработки: –24 ч – за 24 ч до инокуляции, 0 ч – одновременно с инокуляцией. ИТ – инфекционный тип, ; – мелкие некротические пятна; C29 – сорт Саратовская 29; TcSr25 – линия сорта Thatcher с геном *Sr25*; *Pgt1* и *Pgt2* – изоляты.

клетки проявляла яркую зеленую автофлуоресценцию (рис. 3м). Изолят *Pgt2* формировал колонии большего размера, чем *Pgt1*. Через 48–72 ч п/ин в их зоне проявлялась реакция СВЧ, но гифы выходили за ее зону (рис. 3н). В растениях, обработанных СК, через 48–72 ч усиливалась реакция СВЧ, что совпадало с усилением накопления H_2O_2 и NO в тканях (рис. 2д, е). В результате около 60% колоний прекращали развитие через 72 ч п/ин, и гифы не выходили за пределы зоны СВЧ (рис. 3о). После обработки

растений верапамилем и с-РТЮ реакция СВЧ не проявлялась (рис. 3р). После применения донора NO зона интенсивно разрушенных в ходе реакции СВЧ клеток не увеличивалась, но расширялась зона коллапсированных клеток с усиленной окраской цитоплазмы, что свидетельствовало о первых этапах разрушения (рис. 3с). Клетки с интенсивно разрушенной цитоплазмой с яркой зеленой автофлуоресценцией были в центре колоний, а окружающие клетки флуоресцировали слабо (рис. 3т).

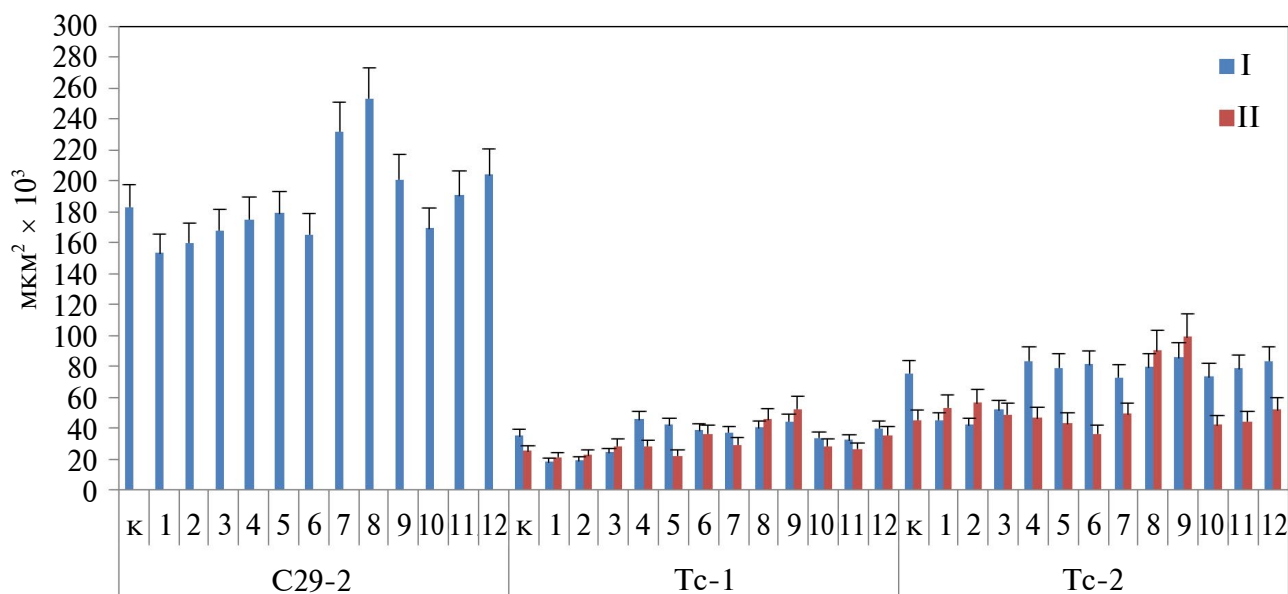


Рис. 4. Влияние обработки фармакологическими препаратами на площадь колоний патогена и зоны реакции СВЧ (240 ч п/ин): площадь, $\text{мкм}^2 \cdot 10^3$: I – колонии, II – зоны некроза. C29-2 – сорт Саратовская 29 инфицированный изолятом *Pgt2*, Tc-1 и Tc-2 – линия Tc.Sr25, инфицированная изолятами *Pgt1* и *Pgt2*, соответственно. Варианты опыта: к – контроль; 1, 2, 3 – обработка СК; 4, 5, 6 – обработка верапамилом; 7, 8, 9 – обработка НП; 10, 11, 12 – обработка с-РТЮ; сроки применения препаратов: 1, 4, 7, 10 – за 24 ч до инокуляции; 2, 5, 8, 11 – одновременно с инокуляцией; 3, 6, 9, 12 – через 24 ч после инокуляции.

Средние размеры колоний авирулентных изолятов в линии Tc.Sr25 после обработки СК сокращались в 1.5–1.9 раза по сравнению с контролем, и размеры зон некроза были близки к ним (рис. 4). При инфильтрации НП одновременно и через 24 ч после инокуляции зоны некроза были больше, чем площадь колоний. При обработке верапамилом и с-РТЮ площадь колоний слабо увеличивалась, а зоны некроза незначительно снижались при ранних сроках применения препаратов.

В научной литературе дискутируется вопрос о порядке возникновения сигналов в ответ на действие биотических и абиотических стрессов и значении АФК и NO в защите растений. Предложена модель, согласно которой в ответ на действие стрессора возникают потоки Ca^{2+} в цитозоль, что приводит к поляризации внешней мембраны и активации Ca^{2+} -зависимой НАДФ·Н-оксидазы, которая продуцирует первичную форму АФК – супероксид-анион $\text{O}_2^{\cdot-}$, превращающийся с помощью супероксиддисмутазы в пероксид водорода H_2O_2 [49]. Вслед за этим в растениях активируются ферменты синтеза NO [50]. На примере *A. thaliana*, инфицированного *Verticillium dahlia* было показано, что обработка растений ингибитором НАДФ·Н-оксидазы и поглотителем H_2O_2 приводит к блокировке образования NO [52]. Отмирание клеток сои в результате реакции СВЧ индуцировалось не NO, а H_2O_2 [40]. Однако, существует мнение, что NO является ключевым

активатором защиты растений-нехозяев (РТИ-системы) и обеспечивает их базовую защиту [18, 51]. При использовании высоких концентрация НП (2.5 мМ) NO был основной причиной реакции СВЧ [21]. После заражения растений вирусами наблюдалась быстрая генерация NO, на основании чего сделано предположение о том, что газ является индуктором реакции СВЧ [53]. После изучения взаимодействия *Puccinia coronata* с овсом предположили, что АФК и NO не являются индукторами реакции СВЧ, но в других экспериментах было показано, что для реализации реакции СВЧ необходимы как NO, так и H_2O_2 [8, 22, 54]. При взаимодействии *A. thaliana* с авирулентными штаммами *Pseudomonas syringae* характерный для СВЧ коллапс клеток растений проявлялся до генерации NO. В связи с этим авторы предполагали, что NO не является триггером СВЧ, а обеспечивает межклеточную передачу сигнала об СВЧ в соседние клетки [17].

Полученные результаты показали, что Ca^{2+} -зависимая генерация супероксид-аниона замыкающими клетками устьиц при контакте с аппрессориями авирулентных изолятов *Pgt* является основной причиной устьичного иммунитета, который предотвращает проникновение патогена в ткань. Эксперименты с использованием НП в качестве донора NO и скавенджера с-РТЮ показали, что оксид азота не имеет существенного значения в реализации этой реакции. В эксперименте с

предобработкой устойчивых растений СК было показано усиление генерации супероксид-аниона, разрушение замыкающих клеток устьиц и накопление в них H_2O_2 , а через 24 ч п/ин следовал всплеск генерации NO. Ранее аналогичный всплеск синтеза NO был отмечен после прекращения развития неспециализированного гриба *P. tritici* на стадии аппрессориев на устьицах при заражении нехозяина *A. thaliana* [18]. Авторы сделали вывод о ключевой роли NO в реализации защиты РТИ-типа, но при этом не изучали динамику генерацию супероксид-аниона. Вероятно, вывод о ключевой роли NO в РТИ является ошибочным.

Полученные в работе результаты изучения взаимодействия устойчивой линии TcSr25 со вторым изолятом, подтвердили совместное участие АФК и NO в реализации реакции СВЧ. Применение фармакологических препаратов с противоположным действием показало, что АФК генерировались раньше и оказывали большее разрушительное действие на клетки растений, чем NO. При этом повышение уровня NO приводило к увеличению числа коллапсированных клеток и повышению проницаемости их цитоплазмы. Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают мнение о том, что NO является скорее сигналом для распространения реакции СВЧ в тканях устойчивых растений-хозяев.

Таким образом, полученные результаты показали, что повышение уровня оксида азота в результате обработки растений НП до или одновременно с инокуляцией стимулировало развитие поверхностных инфекционных структур *Pgt* (ростковых трубок и аппрессориев) на поверхности устойчивых растений, а также усиливало рост колоний в восприимчивом сорте. При взаимодействии *Pgt* с устойчивой линией с геном *Sr25* активные формы кислорода имели решающее значение в предотвращении проникновения патогена в устьица (супероксид-анион) и скорости разрушении цитоплазмы инфицированных клеток (пероксид водорода). NO не влиял на взаимодействие *Pgt* с устьицами растений, но способствовал распространению сигнала о реакции СВЧ на соседние с пораженными клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 22-24-20067), <https://rscf.ru/project/22-24-20067>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAOSTAT. 2021. <https://www.fao.org/faostat> (accessed on 12 May 2024).
2. Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Lagudah E.S., Ayliffe M.A., Bhavani S. et al. // *Phytopathology*. 2015. V. 10. P. 872–884.
3. Hovmøller M.S., Walter S., Bayles R., Hubbard A., Flath K., Sommerfeldt N. et al. // *Plant Pathol.* 2016. V. 65. P. 402–411. <https://doi.org/10.1111/ppa.12433>
4. Baranova O.A., Sibikeev S.N., Konkova E.A. // *Proceedings on Applied Botany. Genetics and Breeding*. 2023. V. 184. № 1. P. 177–186. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-1-177-186>
5. Gulyaeva E., Shaydayuk E., Kosman E. // *Agriculture*. 2022. V. 12. № 1957. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111957>
6. Yuan M., Pok B., Ngou M., Ding P., Xin X.-F. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2021. V. 62. № 102030. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
7. Chen J., Gutjahr C., Bleckmann A., Dresselhaus T. // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 595–611. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.023>
8. Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. // *Nature*. 1998. V. 394. P. 585–588.
9. Аллагулова Ч.Р., Юлдашев Р.А., Авальбаев А.М. // *Физиология растений*. 2023. Т. 70. № 2. С. 115–132. <https://doi.org/10.31857/S0015330322600437>
10. Мамаева А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Новикова Г.В. // *Физиология растений*. 2017. Т. 64. № 5. С. 346–354. <https://doi.org/10.7868/S0015330317050074>
11. Sun C., Zhang Y., Liu L., Liu X., Li B., Jin C., Lin X. // *Hortic. Res.* 2021. V. 8. № 71. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00500-7>
12. Kolbert Z., Barroso J.B., Brouquisse R., Corpas F.J., Gupta K.J., Lindermayr C., et al. // *Nitric Oxide*. 2019. V. 93. P. 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006>
13. Hancock J.T., Neill S.J. // *Plants*. 2019. V. 8. P. 41. <https://doi.org/10.3390/plants8020041>
14. Maslennikova D.R., Allagulova C.R., Fedorova K.A., Plotnikov A.A., Avalbaev A.M., Shakirova F.M. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 665–671. <https://doi.org/10.1134/S1021443717040094>
15. Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Луговая А.А., Швиденко Н.В., Шкляревский М.А., Ястреб Т.О. // *Физиология растений*. 2020. Т. 67. № 4. С. 408–416. <https://doi.org/10.31857/S0015330320030148>
16. Bezrukova M.V., Lubyanova A.R., Maslennikova D.R., Shakirova F.M., Kudoyarova G.R. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. Т. 68. № 2. С. 307–314. <https://doi.org/10.1134/S1021443721010040>
17. Zhang C., Czymmek K.J., Shapiro A. D. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2003. V. 16. P. 962–972.

18. *Shafiei R., Hang C., Kang J.G., Loake G.J.* // Mol. Plant Pathol. 2007. V. 8. P. 773–784.
19. *Khan M., Ali S., Al Azzawi T.N.I., Yun B.-W.* // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 4782.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054782>
20. *Martínez-Medina A., Pescador L., Terrón-Camero L.C., Pozo M.J., Romero-Puertas M.C.* // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. № 17. P. 4489–4503.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz289>
21. *Guo P., Cao Y., Li Z., Zhao B.* // Plant, Cell & Environment. 2004. V. 27. P. 473–477.
22. *Tada Y., Mori T., Shinogi T., Yao N., Takahashi S., Betsuyaku S., et al.* // Mol. Pl.-Micr. Int. 2004. V. 17. P. 245–253.
23. *Qiao M., Sun J., Liu N., Sun T., Liu G., Han S. et al.* // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 7. e0132265.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132265>
24. *Plotnikova L., Knaub V., Pozherukova V.* // Int. J. Plant Biol. 2023. V. 14. P. 435–457.
<https://doi.org/10.3390/ijpb14020034>
25. *McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F.* (Eds.). Wheat Rusts. An Atlas of Resistance Genes. Dordrecht: Springer, 1995. 200 p.
<https://doi.org/10.1071/9780643101463>
26. *Roelfs A.P., Martens J.W.* // Phytopathology. 1988. V. 78. P. 526–533.
27. *Тютеев С.Л.* Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. СПб.: ООО “Инновационный центр защиты растений”. ВИЗР, 2002. 328 с.
28. *Xu H., Heath M.C.* // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 585–597.
<https://doi.org/10.1105/tpc.10.4.585>
29. *Garcia-Mata C., Lamattina L.* // Plant Physiology. 2001. V. 126(3). P. 1196–1204.
<https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1196>
30. *Wang J., Higgins V.J.* // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2006. V. 67. P. 131–137.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.11.002>
31. *Михайлова Л.А., Квитко К.В.* // Микология и фитопатология. 1970. Т. 4. № 4. С. 269–273.
32. *Фатхутдинова Д.Р., Сахабутдинова А.Р., Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Шакирова Ф.М.* // Агрохимия. 2004. № 8. С. 27–31.
33. *Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P.* // New Phytologist. 2001. V. 151. № 2. P. 185–194
34. *Карпец Ю.В., Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А.* // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 1. С. 72–78.
<https://doi.org/10.7868/S0015330314060098>
35. *Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джаилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В.* // Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Издательство МГУ, 2004. 312 с.
36. *Plotnikova L.Y., Meshkova L.V.* // Mikol. Fitopatol. 2009. V. 43. P. 343–357.
37. *Доспехов Б.А.* // Методика полевого опыта. М.: Агропромиздат, 1985. 5 изд. 351 с.
38. *Мамаева А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Мошков И.Е., Мур Л.А.Д., Холл М.А. и др.* // Физиология растений. 2015. Т. 62. С. 459–473.
<https://doi.org/10.7868/S0015330315040132>
39. *Piterková J., Hofman J., Mieslerová B., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A., Petřivalský M.* // Environ. Exp. Bot. 2011. V. 74. P. 37–44.
40. *Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 2001. V. 98. P. 13454–13459.
41. *Fang F.C.* // J. Clin. Invest. 1997. V. 99. P. 2818–2825.
42. *Hunt M.D., Ryals J.A.* // Crit. Rev. Plant. Sci. 1996. V. 15. P. 583–606.
43. *Heath M.C.* // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. P. 321–334.
44. *Melotto M., Zhang L., Oblessuc P.R., He S.Y.* // Plant Physiol. 2017. V. 174. P. 561–571.
45. *Plotnikova L., Pozherukova V., Knaub V., Kashuba Y.* // Agriculture. 2022. V. 12. № 2116.
<https://doi.org/10.3390/agriculture12122116>
46. *Плотникова Л.Я., Пожжерукова В.Е., Митрофанова О.П., Дегтярев А.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 1. С. 74–84.
47. *Calcagno C., Novero M., Genre A., Bonfante P., Lanfranco L.* // Mycorrhiza. 2012. V. 22. P. 259–269.
48. *Cui J.L., Wang Y.N., Jiao J., Gong Y., Wang J.H., Wang M.L.* // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 12540.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12895-2>
49. *Максимов И.В., Черепанова Е.А.* // Успехи современной биологии. 2006. Т. 126. С. 250–261.
50. *Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Dmitriev A.P.* // Cytol. Genet. 2015. V. 49. № 5. P. 338–348.
<https://doi.org/10.3103/S0095452715050047>
51. *Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M.* // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 103–110.
52. *Romero-Puertas M.C., Campostrini N., Mattè A., Righetti P.G., Perazzolli M., Zolla L., et al.* // Proteomics. 2008. V. 8. P. 1459–1469.
53. *Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., Durner J.* // Plant J. 2000. V. 23. P. 817–824.
54. *Romero-Puertas M.C., Delledonne M.* // IUBMB Life. 2003. V. 55 № 10–11. P. 579–583.
<https://doi.org/10.1080/15216540310001639274>

Participation of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Defense of Wheat with the *Sr25* Gene from Stem Rust

V. V. Knaub^a and L. Ya. Plotnikova^{a, *}

^a*Omsk State Agrarian university named after P.A. Stolypin,
Omsk, 644008 Russia*

^{*}*e-mail: lya.plotnikova@omgau.org*

The role of reactive oxygen species (**ROS**) and nitric oxide NO in the protection of common wheat *Triticum aestivum* L. from the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. and Henn. (*Pgt*), was studied on the example of interaction with resistant line of cv. Thatcher with the *Sr25* gene from the wheatgrass *Thinopyrum ponticum* (Tc*Sr25*) and the susceptible cv. Saratovskaya 29 (C29). The seedlings were treated with salicylic acid (**SA**) as an inducer of ROS, and verapamil as Ca²⁺ channel inhibitor, and sodium nitroprusside (**NP**) as NO donor, and 2-phenyl-4, 4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-**PTIO**) as NO scavenger. Isolates with reaction 0 (immunity) and 1 (resistance with hypersensitivity reaction, HR) were used to infect the seedlings. NO stimulated the growing tubes orientation and the formation of *Pgt* appressoria on the surface of resistant plants, and in susceptible plants it increased colony growth if plant were treated one day before or simultaneously with infection. The generation of superoxide anion was the main cause of *Pgt* appressoria death on the stomata of resistant plants, and NO did not affect tissue penetration. ROS induced HR and accelerated the destruction of the cytoplasm of cells. NO was contributed in the expansion of necrosis zone in resistant plants.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Sr25*, ROS, nitric oxide, prehaustorial resistance, hypersensitive reaction

УДК 57.047,581.1

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* 26Д И *Bacillus velezensis* M66 НА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ К ВОЗБУДИТЕЛЮ АЛЬТЕРНАРИОЗА *Alternaria solani*

© 2024 г. А. В. Сорокань^{1, *}, В. Ф. Габдрахманова¹, И. С. Марданшин²,
И. В. Максимов¹

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия

²Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное
подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450059 Россия

*e-mail: fourtyanns@googlegmail.com

Поступила в редакцию 08.05.2024 г.

После доработки 22.06.2024 г

Принята к печати 05.07.2024 г.

Изучено влияние бактерий *Bacillus velezensis* M66 и *Bacillus subtilis* 26Д на устойчивость растений картофеля к некротрофному грибу *Alternaria solani* — возбудителю альтернариоза. Впервые показано накопление жизнеспособных клеток бактерий этих штаммов во внутренних тканях стебля, корней и клубней картофеля на протяжении длительного времени. Выявлено значительное сокращение площади поражения альтернариозом на листьях, инокулированных эндофитами растений, а также ингибирование роста патогена под действием бактериальных штаммов, что может объясняться синтезом липопептидных антибиотиков, гены, отвечающие за синтез которых, были обнаружены методом ПЦР, и протеолитических ферментов, активность которых была показана *in vitro*. Формирование устойчивости растений под влиянием инокуляции *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 сопровождалось накоплением пероксида водорода в первые часы после инфицирования растений спорами *A. solani* и снижением этого показателя на поздних этапах патогенеза за счет увеличения активности каталазы и пероксидаз. Ограничение распространения гриба сопровождалось увеличением активности ингибиторов протеиназ в растениях, что, вероятно, снижало негативное воздействие протеолитических ферментов некротрофного патогена *A. solani*. Можно полагать, что инокуляция растений клетками бактерий штамма *B. velezensis* M66 способствовала формированию устойчивости растений картофеля к альтернариозу посредством эффективного праймирования фитоиммунного потенциала, сравнимого с успешно применяемым в полевых условиях штаммом *B. subtilis* 26Д, активного компонента биопрепарата Фитоспорин-М.

Ключевые слова: картофель, *Bacillus velezensis* M66, *B. subtilis* 26Д, эндофиты, *Alternaria solani*, фитоиммунитет, про-/антиоксидантная система, ингибиторы протеиназ

DOI: 10.31857/S0555109924060064 EDN: QFSBZM

Бурая пятнистость, вызываемая несовершенным грибом *Alternaria solani* Sorauer (1896) является одним из важнейших заболеваний картофеля, распространенных во всех основных регионах выращивания этой культуры. При благоприятных погодных условиях, в теплые и влажные сезоны, это заболевание может привести к серьезным потерям урожая вследствие как преждевременной дефолиации, оказывающей значительное влияние на урожайность, так и прямого поражения клубней [1]. Токсины грибов рода *Alternaria* обладают цитотоксическим, фетотоксическим и тератогенным

действием на животных, а также мутагенным для микробных систем, млекопитающих [2]. Ожидается, что будущие климатические изменения, которые, вероятно, могут привести к повышению уровня CO₂ в атмосфере, увеличат заболеваемость альтернариозом и выработку токсинов патогеном [3]. Известно, что этот фактор существенно влияет на фитогормональный статус и защитный потенциал растений, например, на устьичные реакции, что приводит к их более высокой уязвимости к фитопатогенам, таким как альтернариоз [1]. В свою очередь, это ведет к увеличению объема вносимых

химических средств защиты растений, к которым данный патоген может успешно вырабатывать резистентность [2]. Проблемы в борьбе с распространением заболевания связаны с недостаточными знаниями о механизмах защиты растений от *A. solani*, например, отсутствие выявленных генов устойчивости картофеля к альтернариозу затрудняет получение устойчивых сортов [4]. В этих условиях приоритетной задачей является исследование растений как сложной биологической системы, которая является совокупностью макроорганизма — растения-хозяина, и всех микроорганизмов, которые заселяют экологические ниши в качестве паразитов или мутуалистов [5]. На всю эту систему оказывают влияние биотические и абиотические факторы среды.

Ассоциированные с растениями штаммы видов рода *Bacillus* (*B. thuringiensis* Berliner, *B. subtilis* Cohn, *B. amyloliquefaciens* Priest et al. 1987 и *B. velezensis* Ruiz-Garcia et al. 2005), обнаруженные как эндофиты во многих сельскохозяйственных растениях, являются наиболее известными агентами биологического контроля [5, 6]. Например, штамм бактерии *B. velezensis* SYL-3, выделенный из листьев табака, продемонстрировал ингибирующий эффект против *Alternaria alternata* ((Fr.) Keissl., 1912) и вируса табачной мозаики (ВТМ). С помощью полногеномного секвенирования растительного биота показано, что обработка этим штаммом значительно изменила структуру микробного сообщества на листьях табака и снизила индекс заболеваний, вызываемых *A. alternata* и ВТМ [7]. Сообщается, что выделенный из семян гороха штамм *B. velezensis* LHSB1 продемонстрировал 93.8% ингибирование радиального роста гиф *Agroathelia rolfii* (Sacc.) Redhead & Mullineux, а обработка гороха *Sclerotinia rolfii* Sacc. значительно снизила как заболеваемость, так и тяжесть стеблевой гнили по сравнению с контролем, даже по сравнению с обработкой фунгицидом [8]. Прямые механизмы защиты растений эндофитами реализуются преимущественно за счет секреции бактериями-эндофитами метаболитов, обладающих антибиотической активностью, главным образом антимикробных пептидов (циклических липопептидов, сидерофоров, поликетидов и др.), а также гидролитических ферментов — хитиназ, глюканаз, протеаз, липаз, амилаз, лактамаз и целлюлаз, разрушающих клетки патогенных грибов [9, 10].

Липопептиды — одна из основных групп бактериальных метаболитов, которые представляют большой интерес для ученых благодаря своей полифункциональности и в настоящее время активно изучаются в том числе и авторами работы [9]. Липопептиды бактерий рода *Bacillus* — сурфактины, итурины и фенгицины — обладают широким спектром биоцидного, бактерицидного, фунгицидного и инсектицидного действия [9, 11]. Липопептиды

проявляют антагонизм по отношению к другим организмам благодаря своей способности связывать липиды плазматической мембраны и изменять проницаемость или разрушать ее структуру, образуя в ней поры, как в случае фенгицина и итурина, или растворяя ее, как в случае сурфактина [12, 13]. Полногеномное секвенирование штаммов *B. velezensis* выявляет большое количество кластеров биосинтетических генов, кодирующих ферменты синтеза многочисленных антимикробных соединений, включая липопептиды, в том числе сурфактин, итурин, фенгицин и плипстаин [13]. Так, выделенный из ризосферы табака штамм *B. velezensis* EM-1 также продемонстрировал сильный ингибирующий эффект на *A. alternata*, *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996 и *Phytophthora nicotianae* Breda de Naan, 1896, что авторы связывают с продукцией бактериями итурина А, макролактина А и макролактина W, а также с увеличением активности каталазы и полифенолоксидазы в табаке [14]. В работе [15] было показано, что штамм *B. subtilis* 26Д продуцирует сурфактины.

Неоднократно показана способность эндофитных микроорганизмов индуцировать устойчивость растений к различным патогенам, в том числе — возбудителям фитофтороза, среди которых наиболее экономически значим оомицет *P. infestans* (Mont.) de Bary [10, 16]. Роль эндофитов в развитии защитных реакций растений против патогенов тесно связана с регуляцией активности про-/антиоксидантной системы, например, НАДФ-оксидазы и пероксидазы, а также генерации/утилизации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, пероксида водорода [4] и лигнификации пораженных тканей [17]. Лигнификация и суберинизация — это опосредованные пероксидазой процессы, в которых пероксид водорода необходим для перекисного окисления монолигнолов и фенольных компонентов [4, 17]. Было показано, что *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* могут стимулировать биосинтез лигнина посредством активации пероксидазы в инфицированных растениях [10]. Умеренно чувствительный к *A. solani* сорт картофеля Désirée, в отличие от восприимчивых линий (дефицитных по синтезу салициловой кислоты и нечувствительных к жасмонатам), характеризовался активной генерацией перекиси водорода в месте внедрения патогена [4].

Значительная роль в защитных системах растений принадлежит ингибиторам гидролаз микроорганизмов, например, трипсиноподобных экзопротеиназ у оомицета *Phytophthora infestans* [9]. У мутантов *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire, 1947 с нарушением единичных генов гидролитических ферментов, в том числе химотрипсина, N-ацетилглюкозаминидазы и сериновых протеаз, не наблюдается снижения вирулентности, что связано с функциональной избыточностью семейств

генов, свидетельствующая об их критической важности [19]. Повышенная активность ингибиторов протеазы в листьях томата после обработки альгинатом натрия также связывают с ограничением развития симптомов инфекции *A. solani* в листьях томата [20].

В связи с этим цель работы — оценка влияния бактерий штаммов *B. velezensis* М66 и *B. subtilis* 26Д на развитие защитных реакций растений картофеля, инфицированных некротрофным грибом *A. solani*.

МЕТОДИКА

Растительный и микробный материал. В работе использовали стерильные растения *Solanum tuberosum* L. сорта Алексеевский, полученные методом микроклонирования, выращенные в пробирках со средой Мурасиге и Скуга в климатической камере KBW E6 (“Binder GmbH”, Германия) с 16-часовым световым периодом при 20–22°C в течение 21 сут.

Культура бактерий штамма *B. subtilis* 26Д подерживается в коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики УФИЦ РАН [21]. Клетки бактерии *B. velezensis* М66 были выделены из внутренних тканей стеблей картофеля сорта Удача (Башкортостан, Россия). Штамм депонирован в коллекции института [21], а последовательность 16S рРНК зарегистрирована в базе GenBank (accession number PP396155). Культуры бактерий выращивали на жидком лизогенном бульоне (LB) (триптон — 1%, дрожжевой экстракт — 0.5%, NaCl — 0.5%) при 20–22°C на лабораторных шейкерах OS-20 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин.

Для формирования системы “Растение + эндوفит” стерильные 15-дневные растения картофеля инокулировали по ранее описанной методике [22] клетками бактерий *B. velezensis* М66 и *B. subtilis* 26Д, выращенными на жидкой питательной среде LB в течение суток. Затем, после центрифугирования в течение 15 мин при 4000 g на микроцентрифуге Eppendorf 5415R (США) бактерии ресуспендировали в стерильной дистиллированной воде (титр был выровнен до 1×10^8 кл./мл). Бактериальную суспензию микробиологической петлей (5 мкл) наносили на нижнюю треть стебля (5×10^5 кл./растение). На стебли контрольных растений наносили по 5 мкл воды.

Фитопатоген и инокуляция. Патогенный грибок *A. solani* U2022 выделен из листьев картофеля сорта Удача с видимыми симптомами заболевания в 2022 г. (место выделения — г. Уфа, Башкортостан). Моноспоровая культура была определена до вида по морфологическим признакам [23], что для крупноспорового вида *A. solani* считается возможным ведущими специалистами [24]. Патоген

выращивали на агаризованной ржаной среде в течение 7 сут [25]. Поверхность колоний промывали дистиллированной водой при температуре 4°C в течение 30 мин, после чего оценивали в камере Фукса—Розенталя количество конидий. Растения инфицировали путем нанесения 20 мкл суспензии спор (10^5 спор/мл) патогена (по 5 мкл на 4 верхних листа) на 7 сут после инокуляции бактериальной массой [26]. Исследование симптомов проводили с использованием фитопатологических газонов, на 8 сут после заражения растений грибом, пораженность определяли в процентах площади поражения к общей площади листьев. Изображения исследовали с помощью программного обеспечения ImageJ (“NIH”, США).

Определение титра бактерий в тканях растений. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов в тканях растений определяли через 30 сут после инокуляции растений картофеля бактериями штаммов *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* М66 отдельно в побегах, корнях и образовавшихся мини-клубнях. Для этого навески органов растений поверхностно стерилизовали по следующей схеме: 70%-ный этанол — 1 мин; 0.33%-ный перексид водорода — 3 мин; дистиллированная вода [22, 26]. Перед стерилизацией кожура с мини-клубней удалялась. Навески растений гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках с добавлением 2 мл стерильной воды. Аликвоты гомогената распределяли по поверхности среды LB шпателем Дригальского до полного высыхания. Чашки Петри инкубировали при температуре 28°C в термостате ТС–1/20 СПУ (“Смоленское СКТБ СПУ”, Россия) в течение 24 ч. Подсчет КОЕ производили во втором и третьем разведении, пересчитывая на 1 г сырой массы растений [26].

Биохимические исследования. Навеску пробирочных растений растирали в 0.025 М фосфатном буфере (ФБ), pH 6.2, в соотношении 1 : 5, экстрагировали 30 мин при 4°C и затем центрифугировали 10 мин при 8000 g на микроцентрифуге Eppendorf 5415R (США).

Содержание пероксида водорода оценивали при помощи реагента, который содержал 0.074% соли Мора в 5.81%-ной серной кислоте и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82%-ном сорбите (в соотношении 1 : 100). К 250 мкл реагента добавляли 25 мкл супернатанта, полученного так, как описано выше. Реакционную смесь инкубировали в течение 45 мин в термостате при 30°C, затем центрифугировали 10 мин при 10000 g и вносили по 200 мкл супернатанта в лунки плоскодонных планшетов. Оптическую плотность реакционной смеси измеряли на планшетном спектрофотометре EnSpire® (“PerkinElmer”, США) при 560 нм [26].

Для определения активности ингибитора трипсина к 25 мкл 0.05 М трис-HCl-буфера, pH 8.2, добавляли 50 мкл растительного экстракта,

полученного вышеописанным методом, 25 мкл трипсина (1 мг/мл), а затем 50 мкл (1 мг/мл) раствора N- α -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилид (БАПНА) и инкубировали в термостате при 37°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали 25 мкл 30%-ной уксусной кислоты. В качестве контроля использовали смесь, состоящую из всех описанных компонентов, но уксусную кислоту добавляли в лунки планшет перед их внесением. Оптическую плотность полученных растворов определяли на планшетном спектрофотометре EnSpire® (“PerkinElmer”, США) при 405 нм. Активность ингибитора выражали в ингибиторных единицах (TIU) [27].

Для определения пероксидазной активности супернатант разбавляли в 30–50 раз в ФБ (pH 6.2) и закапывали в лунки плоскодонных планшетов для иммуноанализа (“Nunc”, США) в следующем порядке: 75 мкл образца, 25 мкл 0.08%-ного орто-фенилендиамина, 25 мкл 0.016%-ной перекиси водорода. Реакцию останавливали, добавляя 50 мкл 4 н серной кислоты.

Для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) реакцию инициировали добавлением супернатанта к 65 мМ перекиси водорода в 50 мМ растворе ФБ (pH 7.8). Смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 мин. Реакцию останавливали добавлением 32.4 мМ молибдата аммония. В контрольную пробу вместо супернатанта добавляли дистиллированную воду. Оптическую плотность измеряли на приборе для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“Bio-Rad”, США) при 490 нм (пероксидаза) и 410 нм (каталаза) [25].

Антагонистическая активность штамма. Для определения прямой противогрибковой активности штамма участок мицелия диаметром 5 мм,

взятый из 7-суточной культуры *A. solani*, помещали на одну сторону чашки Петри с картофельно-глюкозным агаром (КГА). Суспензию суточной культуры исследуемых штаммов бактерий наносили на другую сторону среды штрихом с использованием микробиологической петли (5 мкл). Двойную культуру культивировали при 25°C в течение 7 дней, в 5 повторностях [27].

Идентификация генов липопептидсинтетаз с помощью ПЦР. Геномную ДНК из клеток бактерий выделяли с помощью лизирующего буфера, содержащего 1% смолы Chelex100 (“BioRad Laboratories”, США), 1% Triton X100, 1% Tween 20. и 0.005% крезолового красного. Гены липопептидсинтетаз идентифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами (табл. 1), подбор и проверка специфичности которых были выполнены при помощи сервисов Primer Explorer 5 (LAMP Primerdesigning Software: <http://primerexplorer.jp/e/>), VNT19 и BLAST NCBI. ПЦР проводили в амплификаторе ТП4-ПЦР-01- “Терцик” (“ДНК-Технология”, Москва, Россия). Праймеры к гену *Bac*, кодирующему 16S РНК *Bacillus* spp., использовались в качестве внутреннего контроля. Продукты ПЦР разделяли в 7%-ном ПААГ, окрашенном бромидом этидия.

Для определения протеолитической активности бактериальные клетки при помощи петли помещали на поверхность 3%-ного агара из обезжиренного молока в чашках Петри. Культуры выращивали в течение 48 ч при 37°C. Протеолитическая активность штаммов определялась путем измерения зон вокруг колоний на через 48 ч после размещения. Эксперименты проводились трижды в 5 повторностях.

Статистика. Все опыты проведены в 3–5 биологических и 3 аналитических повторностях.

Таблица 1. Праймеры, использованные для исследования присутствия генов липопептидсинтетаз *B. velezensis* M66

Продукт гена	Номер гена в NCBI	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Последовательность праймера, 5'→3'
Фосфопантенил трансфераза	KT750873	~730	ATGAAGATTTACGGAATTTA TTATAAAAGCTCTTCGTACG
Сурфактин синтетаза	EU882341	~675	ATGAAGATTTACGGAATTTATATG TTATAAAAGCTCTTCGTACGAG
Итурин синтетаза А	D21876	~600	ATGAAAATTTACGGAGTATATATG TTATAACAGCTCTTCATACGTT
Итурин синтетаза В	KR149331	~675	AAGAAGGCGTTTTTTCAAGCA CGACATACAGTTCTCCCGGT
Фенгицин синтетаза	AJ011849	~964	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT GCTGTCCGTTCTGCTTTTC
16S рибосомальная РНК	NR102783	~800	ACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC GGCGGAAACCCCTAACACT

Экспериментальные данные выражали в виде средних значений $\pm$ стандартные ошибки, значения которых рассчитывали для всех вариантов обработок с использованием MS Excel. Значимость различий оценивали с применением однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом Дункана ($p < 0.05$) с помощью программного обеспечения STATISTICA 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка числа жизнеспособных клеток бактерий в тканях растений картофеля показала присутствие $100.7 \times 10^4 \pm 18.13$ КОЕ *B. velezensis* M66 на г сырой массы побегов к 30 сут после инокуляции, что статистически не отличалось от показателей, характерных для *B. subtilis* 26Д (табл. 2). В корнях растений содержание бактерий было на порядок меньше для обоих штаммов. Впервые было показано, что во внутренней части полученных на экспериментальных растениях микроклубнях содержатся бактерии, $4.0 \times 10^4 \pm 1.35$ КОЕ *B. subtilis* 26Д на г сырой массы, и несколько меньше у *B. velezensis* M66 — $2.7 \times 10^4 \pm 0.38$ КОЕ на г сырой массы клубня. Таким образом, исследованные штаммы бактерий персистируют в растительных тканях длительное время и способны заселять в том числе формирующиеся клубни, что открывает перспективы защиты растений в том числе в послеуборочный период. Ранее было показано, что обработка клубней картофеля бактериями *B. subtilis* 26Д [27] и *B. subtilis* 10—4 [29] перед закладкой на хранение способствовало увеличению их устойчивости к *P. infestans* и *Fusarium oxysporum* Schltdl., 1824 при искусственном инфицировании, и, вероятно, этот эффект был связан с их проникновением во внутренние ткани клубня.

Ранее было показано, что под влиянием салициловой кислоты происходит увеличение количества клеток бактерии *B. subtilis* 26Д в тканях побегов картофеля, что может быть одним из факторов, обуславливающих более высокий защитный эффект против фитофтороза, чем в варианте обработки только *B. subtilis* 26Д, на фоне крайне низкого воздействия взятой концентрации салициловой кислоты на устойчивость растений к патогену [26].

Обработка растений картофеля исследуемыми штаммами приводила к существенному снижению проявления симптомов альтернариоза на листьях. При этом достоверных различий между бактериальными обработками не наблюдалось (рис. 1а), как и в антагонистической активности штаммов против возбудителя альтернариоза, что выражалось в значительном подавлении роста мицелия гриба на среде КГА (рис. 1б).

Антагонистическая активность исследуемых штаммов *in vitro* может объясняться биосинтезом липопептидных антибиотиков. Так, широко

Таблица 2. Количество жизнеспособных клеток (КОЕ) бактерий *B. velezensis* M66 в тканях картофеля через 30 сут после инокуляции

Штамм	Содержание КОЕ, 10^4 /г сырой массы		
	Побег	Корень	Клубень
<i>B. subtilis</i> 26Д	79.2 ± 14.46^a	16.5 ± 3.65^b	4.0 ± 1.35^c
<i>B. velezensis</i> M66	100.7 ± 18.13^a	9.8 ± 2.03^b	2.7 ± 0.38^c

Примечание. Разными буквами обозначены показатели, имеющие статистически значимые отличия друг от друга ($p \leq 0.05$).

изученный штамм *B. subtilis* 26Д синтезирует значительное количество сурфактина, что было показано методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрораспылительного масс-спектрометрического детектирования [15, 30]. Этот штамм обладает генами сурфактинсинтетазы и фенгидинсинтетазы. В геноме штамма *B. velezensis* M66 было определено наличие последовательности (~600 п.н.) гена итуринсинтазы А, ключевого фермента биосинтеза липопептида итурина (рис. 2а). Помимо этого, исследуемые штаммы имели сравнимую протеолитическую активность, что выражалось в наличии гало вокруг колоний на 3%-ном сухом молоке (рис. 2б).

Эндофитные микроорганизмы принимают активное участие в защите растений, не только конкурируя с патогенами за экологическую нишу [5, 10], но и стимулируя защитные механизмы растений [6, 17, 20]. Так, анализ биохимических показателей выявил, что исследуемые штаммы бактерий практически не оказывали влияние на состояние про-/антиоксидантной системы и активность ингибиторов протеиназы в неинфицированных растениях (рис. 3). Заражение возбудителем альтернариоза растений картофеля, обработанных водой и обоими штаммами бактерий, способствовало одинаковому (около 20%) увеличению содержания пероксида водорода через 1 ч после нанесения спор патогена. Через 24 ч после инфицирования этот уровень сохранился в растениях, обработанных водой и клетками *B. velezensis* M66, а в обработанных клетками *B. subtilis* 26Д — вернулся к контрольным показателям. Важно отметить, что через 6 сут после инфицирования в растениях, не содержащих бактерий, наблюдалось двукратное повышение содержания пероксида водорода относительно контрольных показателей, что, вероятно, отражает процессы развития болезни под воздействием некротрофного патогена *A. solani* [4]. Под действием исследуемых бактериальных штаммов содержание пероксида водорода через 6 сут после инфицирования, напротив, снижалось относительно здоровых растений, обработанных водой. Следует отметить,

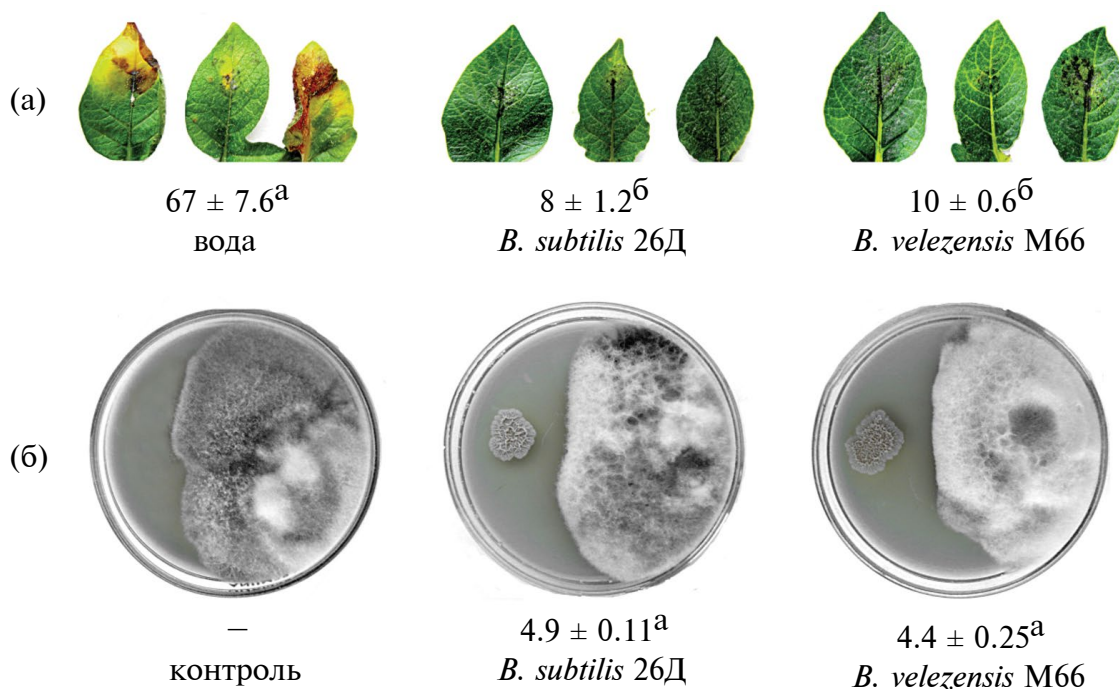


Рис. 1. Площадь проявления симптомов альтернариоза (а) на листьях картофеля в контроле и под влиянием *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 (цифрами показан % пораженной площади листовой пластинки), и подавление роста культуры гриба *A. solani* (б) исследуемыми штаммами (цифрами показано расстояние между колониями бактерии и гриба). Разными буквами обозначены статистически значимые отличия показателей (при $p \leq 0.05$).

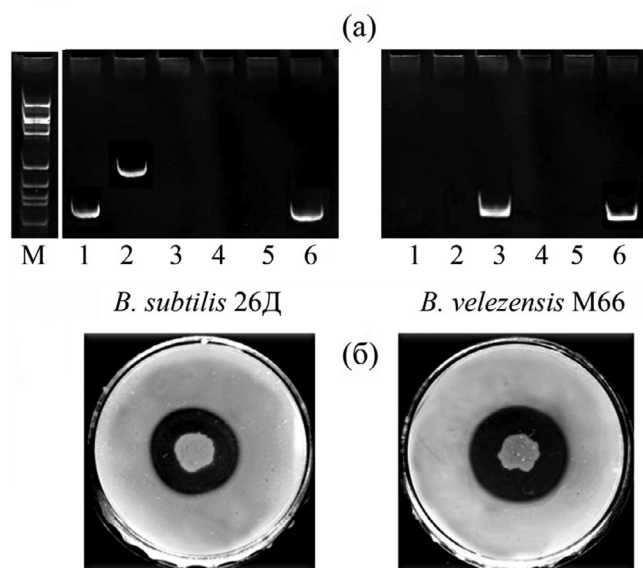


Рис. 2. Антагонистические свойства *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 против патогенов. (а) – фотография полиакриламидного геля после разделения продуктов ПЦР последовательностей ДНК бактерий с праймерами к генам, кодирующими ферменты биосинтеза липопептидов: 1 – фосфопантетеинил трансфераза; 2 – сурфактин синтаза; 3 – итуринсинтаза А; 4 – итуринсинтаза В; 5 – фенгидинсинтаза; 6 – ген домашнего хозяйства 16S рРНК; (б) – рост колоний *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* M66 на 3%-ном обезжиренном молочном агаре.

что через 1 ч и через 24 ч после инфицирования в растениях, обработанных бактериями, поддерживалась повышенная относительно контрольных показателей активность каталазы. Вероятно, это позволило деактивировать перекись водорода в растительных клетках, сохраняя их жизнедеятельность. Точно также, как и в экспериментах в настоящей работе, эндофитный гриб *Aspergillus terreus* Thom, 1918, выделенный из листьев базилика *Ocimum basilicum* L., продемонстрировал непосредственную противогрибковую активность против гриба *A. solani*, а заражение обработанных этим грибом растений баклажана патогеном *A. solani* вызывало повышение уровня активности супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы, что было причиной меньшего развития пятнистости [31]. Обработка растений альгинатом натрия также существенно снизила пораженность *A. solani* и значительное повышение уровня экспрессии гена супероксиддисмутазы [20]. Продуцирующий липопептиды (в основном, фенгидин) штамм *B. subtilis* CtrpXS2-1 показал высокую противогрибковую активность против *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, 1968, а так же способность индуцировать физиологическую устойчивость растений люпина против этого патогена. Авторы публикации связали это с увеличением уровня транскриптов хозяйских генов PR-1, PR-4, SOD, PIN-1

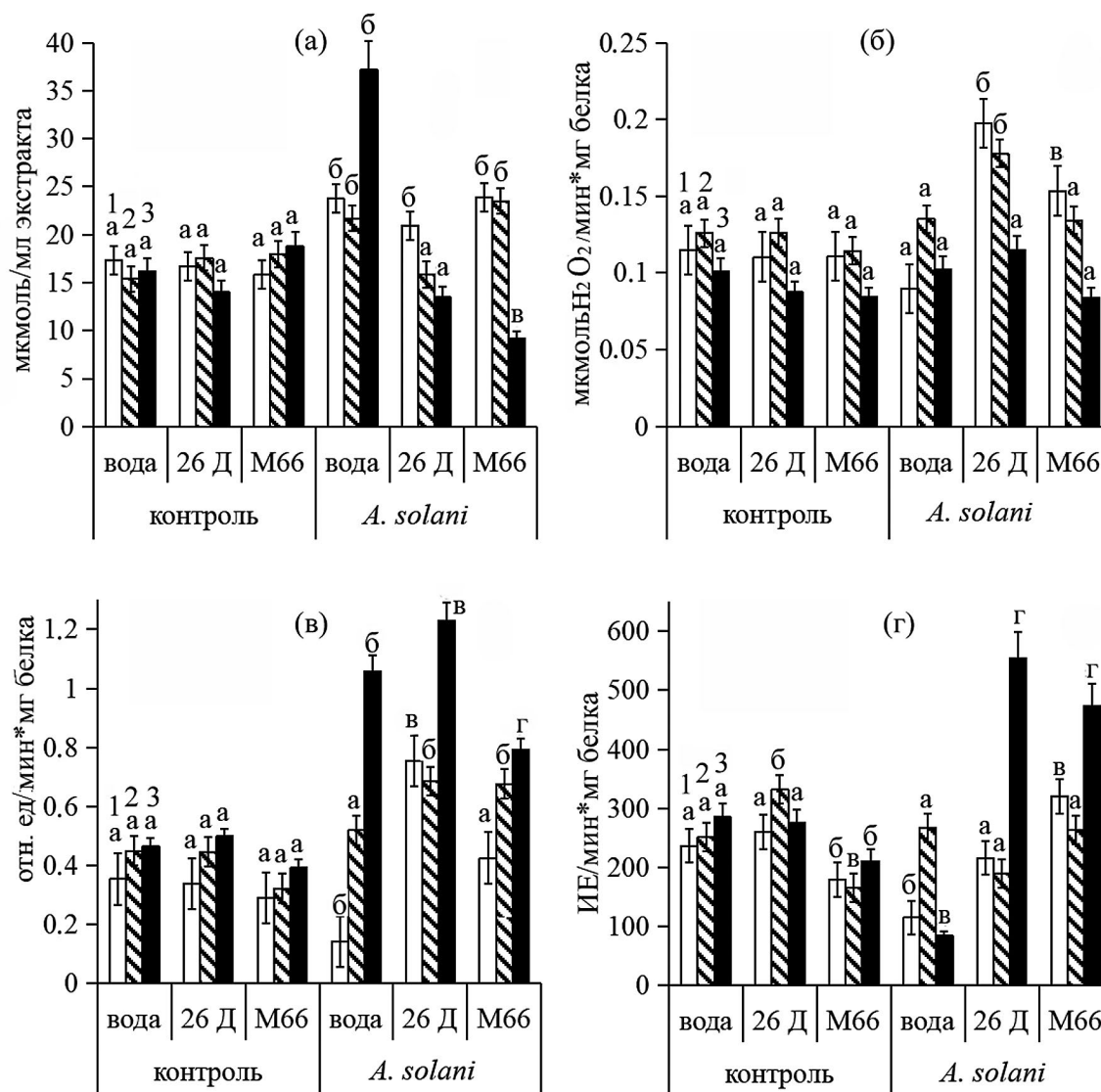


Рис. 3. Влияние бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. velezensis* М66 на содержание пероксида водорода (а), активность каталазы (б), пероксидаз (в) и ингибиторов трипсина (г) в здоровых и инфицированных возбудителем альтернариоза растениях картофеля: 1 – 1 ч, 2 – 24 ч, 3 – 6 сут после нанесения спор патогена. Разными буквами обозначены статистически значимые отличия показателей, наблюдаемых в соответствующей временной точке (при $p \leq 0.05$).

и PIN-3, а также увеличением активности каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы [32].

Обращает на себя внимание двукратное снижение активности пероксидаз в инфицированных *A. solani* контрольных растениях через 1 ч (увеличение этого параметра произошло только через 6 сут) и ингибиторов протеиназ через 1 час и 6 сут после нанесения спор патогена, что указывает на активное подавление иммунных реакций растений патогеном в этом варианте. При этом через 1 ч после инфицирования в обработанных *B. subtilis* 26Д растениях картофеля увеличивалась активность пероксидаз (на 1/3 относительно контрольных показателей), а в обработанных *B. velezensis* М66 – активность ингибиторов протеиназ. В обоих случаях

активность ингибиторов протеиназ и пероксидаз была выше контрольных показателей на поздних этапах взаимодействия с патогеном как в случае *B. velezensis* М66, так и *B. subtilis* 26Д. Так как одним из основных факторов агрессивности патогенов являются продуцируемые ими гидролазы, обеспечивающие внедрение гриба в ткани, например, за счет разрушения клеточных стенок растений и деградации защитных белков [18], выработка их ингибиторов в растениях может быть эффективным механизмом ограничения патогенного процесса.

Полученные результаты показали эффективность биопрепарата на основе эндофитных бактерий *B. velezensis* М66, сравнимую с широко применяемым штаммом *B. subtilis* 26Д в защите растений

картофеля от альтернариоза как путем прямого воздействия на патоген, который наблюдали *in vitro*, так и индуцирования ими защитного ответа, связанного с регуляцией редокс-статуса растений и выработки ими ингибиторов протеиназ. Использование *B. velezensis* M66 в качестве компонентов биопрепаратов для защиты растений благодаря глубокой интеграции в систему регуляции фитоиммунного потенциала растений, невысокой стоимости, низкой энергоемкости при производстве, возможность сочетания с другими профилактическими мерами, неспособность вызывать инфекционные процессы в организме человека и животных, и непатогенности для растений является весьма перспективным.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 24-26-00025 “Перспектива применения выделенных на территории Южного Урала эндофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к комплексу биотических факторов среды”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных либо с участием людей в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fagodiya R.K., Trivedi A., Fagodia B.L. // Sci. Rep. 2022. V. 12. P. 6131–6147. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10108-z>
2. Fernandes C., Casadevall A., Gonçalves T. // FEMS Microbiol. Rev. 2023. V. 47. № 6. A. fuad061. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad061>
3. Miranda-Apodaca J., Artetxe U., Aguado I., Martin-Souto L., Ramirez-Garcia A., Lacuesta M., et al. // Plants. 2023. V. 12. № 6. P. 1304–1321. <https://doi.org/10.3390/plants12061304>
4. Brouwer S.M., Odilbekov F., Burra D.D., Lenman M., Hedley P.E., Grenville-Briggs L., et al. // Plant Mol. Biol. 2020. V. 104. № 1–2. P. 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01019-6>
5. Wu X., Wang Z., Zhang R., Xu T., Zhao J., Liu Y. // Archives of Microbiology. 2022. V. 204. № 4. P. 213. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02824-x>
6. Kim J.A., Song J.S., Kim P.I., Kim D.H., Kim Y. // J. of Fungi. 2022. V. 8. № 10. P. 1053. <https://doi.org/10.3390/jof81010532>
7. Liu H., Jiang J., An M., Li B., Xie Y., Xu C., Jiang L., Yan F., Wang Z., Wu Y. // Front Microbiol. 2022. V. 13. A. 840318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840318>
8. Chen L., Wu Y.D., Chong X.Y., Xin Q.H., Wang D.X., Bian K. // J. Appl. Microbiol. 2022. V. 128. P. 803–813. <https://doi.org/10.1111/jam.14508>
9. Maksimov I.V., Singh B.P., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Khairullin R.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 14. P. 15–28. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>
10. Liu D., Li K., Hu J., Wang W., Liu X., Gao Z. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20(12). P. 2908. <https://doi.org/10.3390/ijms20122908>
11. Andri S., Meyer T., Rigolet A., Prigent-Combaret C., Höfte M., Balleux G. et al. // Microbiol. Spectr. 2021. V. 9. A. e0203821. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02038-21>
12. Cawoy H., Debois D., Franzil L., De Pauw E., Thonart P., Ongena M. // Microb. Biotechnol. 2015. V. 2. P. 281–295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
13. Fazle Rabbee M., Baek K.H. // Molecules. 2020. V. 25. № 21. P. 4973–4985. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
14. Sui X., Han X., Cao J., Li Y., Yuan Y., Gou J. et al. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. A. 940156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.940156>
15. Черепанова Е.А., Галютдинов И.В., Бурханова Г.Ф., Максимов И.В. // Прикл. биохимия микробиология. 2021. Т. 57. №?? С. 496–503. <https://doi.org/10.31857/S0555109921050032>
16. Cheffi M., Bouket A.C., Alenezi F.N., Luptakova L., Belka M., Vallat A., et al. // Microorganisms. 2019. V. 7. № 9. P. 314. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090314>
17. Liu S., Zha Z., Chen S., Tang R., Zhao Y., Lin Q., Duan Y., Wang K. // J. Sci. Food. Agric. 2023. V.103. № 5. P. 2675–2680. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12272>
18. Kudriavtseva N.N., Sofin A.V., Revina T.A., Gvozdeva E.L., Ievleva E.V., Valueva T.A. // App. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. № 5. P. 513–521. <https://doi.org/10.7868/S0555109913050073>
19. Cho Y. // Eukary Cell. 2015. V. 14. P. 335–344. <https://doi.org/10.1128/EC.00226-14>
20. Dey P., Ramanujam R., Venkatesan G., Nagarathnam R. // PLoS One. 2019 V. 14(9). A. e0223216. <http://ibg.anrb.ru/wp-content/uploads/2019/04/Katalog-endofit.doc> (available on 25.05.2024)
21. Sorokan A., Veselova S., Benkovskaya G., Maksimov I. // Plants. 2021. V. 10. P. 923–938. <https://doi.org/10.3390/plants10050923>
22. Ганнибал Ф.Б. /Ред. М.М. Левитина. СПб.: ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии., 2011. 70 с.
23. Ганнибал Ф.Б., Орина А.С. // Микология и фитопатология. 2022. Т. 56. № 6. с. 431–440

24. Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. // Plant Dis. 2012. V. 96. № 1. P. 4–17. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>
25. Сорокань А.В., Бурханова Г.Ф., Алексеев В.Ю., Максимов И.В. // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. Т. 53. С. 109–130. <https://doi.org/10.17223/19988591/53/6>
26. Sorokan A., Benkovskaya G., Burkhanova G., Blagova D., Maksimov I. // Plants. 2020. V. 9. A. 1115. <https://doi.org/10.3390/plants9091115>
27. Максимов И.В., Пусенкова Л.И., Абизгильдина Р.Р. // Агрохимия. 2011. № 6. С. 43–48.
28. Lastochkina O., Baymiev A., Shayahmetova A., Garshina D., Koryakov I., Shpirnaya I. et al. // Plants. 2020. V. 9. P. 76–81. <https://doi.org/10.3390/plants9010076>
29. Rumyantsev S.D., Alekseev V.Y., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Garafutdinov R.R. et al. // Life. 2023. V. 13. P. 214–226. <https://doi.org/10.3390/life13010214>
30. Attia M.S., Hashem A.H., Badawy A.A. // Bot. Stud. 2022. V. 63. P. 26–38. <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00357-6>
31. Yáñez-Mendizábal V., Falconí C.E. // Biotechnol. Lett. 2021. V. 43. № 3. P. 719–728. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03066-x>

Influence of Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis* 26D and *Bacillus velezensis* M66 on the Resistance of Potato Plants to the Early Blight Pathogen *Alternaria solani*

A. V. Sorokan^{a,*}, V. F. Gabdrakhmanova^a, I. S. Mardanshin^b, and I. V. Maksimov^a

^a*Institute of Biochemistry and Genetics – a separate structural division of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^b*Bashkir Research Institute of Agriculture – a separate structural division of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450059 Russia*

*e-mail: fourtyanns@googlegmail.com

The effect of *Bacillus velezensis* M66 and *Bacillus subtilis* 26D bacteria on the resistance of potato plants to the causative agent of potato early blight necrotrophic fungus *Alternaria solani* was studied. For the first time, accumulation of viable bacterial cells of these strains in the internal tissues of potato stems, roots and tubers over a long period of time was shown. A significant reduction of the damaged by the early blight area of leaves inoculated with plant endophytes was revealed, as well as inhibition of pathogen growth under the influence of bacterial strains, which can be explained by the synthesis of lipopeptide antibiotics, the genes responsible for the synthesis of which were detected by PCR, and proteolytic enzymes, the activity of which was shown *in vitro*. Increase of plant resistance to the pathogen under the influence of inoculation with *B. subtilis* 26D and *B. velezensis* M66 was accompanied by the accumulation of hydrogen peroxide in the first hours after infection of plants with *A. solani* spores and a decrease in this parameter at the late stages of pathogenesis due to an increase of the activity of catalase and peroxidases. Limitation of the spread of the fungus was accompanied by an increase in the activity of proteinase inhibitors, which probably reduced the negative impact of proteolytic enzymes of the necrotrophic pathogen *A. solani* on plants. It can be assumed that inoculation of plants with bacterial cells of the *B. velezensis* M66 strain contributed to the increase of plant resistance to the early blight effectively priming the phytoimmune potential, comparable to the *B. subtilis* 26D strain, the active component of the biopreparation Fitosporin-M, which successfully used under the field conditions, .

Keywords: potato, *Bacillus velezensis* M66, *B. subtilis* 26D, endophytes, *Alternaria solani*, phytoimmunity, pro-/antioxidant system, proteinase inhibitors

УДК 571.27:632.4:632.938:633.11

ВЛИЯНИЕ КОНЬЮГАТА ХИТОЗАНА С КОФЕЙНОЙ КИСЛОТОЙ И *Bacillus subtilis* НА ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ВИРУСНОМ ЗАРАЖЕНИИ И ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХЕ

© 2024 г. Ж. Н. Калацкая^{1, *}, Л. Г. Яруллина², Н. А. Еловская¹, Г. Ф. Бурханова²,
Е. И. Рыбинская¹, Е. А. Заикина², И. А. Овчинников¹, В. О. Цветков³, К. М. Герасимович¹,
Е. А. Черепанова², О. А. Иванов¹, К. С. Гилевская⁴, В. В. Николайчук⁴

¹Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, 220072 Республика Беларусь

²Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
Уфа, 450054 Россия

³Уфимский университет науки и технологий, Уфа, 450076 Россия

⁴Институт химии новых материалов НАН Беларуси,
Минск, 220141 Республика Беларусь

*e-mail: kalatskayaj@mail.ru

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 20.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

В работе оценивали влияние конъюгата хитозан-кофейная кислота (Хит-КК), отдельно и в смеси с *Bacillus subtilis* 47 на защиту растений от Y-вируса картофеля (YBK) при оптимальном увлажнении и в условиях водного дефицита. При обработке Хит-КК и смесью Хит-КК + *B. subtilis* 47 здоровых растений картофеля при оптимальных условиях почвенного увлажнения выявлено накопление пролина и фенольных соединений, активация полифенолоксидазы, что приводило к повышению неспецифической устойчивости растений. Обработка Хит-КК снижала уровень инфицирования YBK у растений картофеля в оптимальных условиях и при водном дефиците, увеличивая массу мини-клубней картофеля. Обработка смесью Хит-КК + *B. subtilis* 47 была эффективна только в условиях водного дефицита. Выявлено, что решающим фактором в формировании устойчивости растений картофеля к Y-вирусу при применении Хит-КК является изменение прооксидантно-антиоксидантного статуса клеток растений.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., Y вирус картофеля (YBK), *Bacillus subtilis* 47, конъюгат, кофейная кислота, водный дефицит, про-/антиоксидантная система, продуктивность мини-клубней

DOI: 10.31857/S0555109924060074 EDN: QFLPNI

В связи с растущим спросом на продовольствие во всем мире, ключевой задачей ближайших десятилетий является устойчивое развитие сельского хозяйства [1]. Картофель является четвертой по популярности потребления человеком культурой после риса, пшеницы и кукурузы [2]. Однако растения картофеля часто подвергаются воздействию комбинации различных неблагоприятных факторов, которые снижают их урожайность и качество клубней, что приводит к экономическим потерям и снижению производства продовольствия [3, 4]. Рост растений картофеля и урожайность клубней в значительной степени зависят от влажности почвы. Даже короткие периоды водного стресса могут иметь заметные последствия. Проблема

водоснабжения также возникает в регионах с достаточным, но неравномерным количеством осадков в течение вегетационного периода [5]. Существуют также свидетельства того, что изменение климата влечет расширение ареала обитания патогенов [3, 6]. Вирусные заболевания картофеля являются одной из основных проблем, вызывающих ухудшение качества клубней и снижение урожайности [7].

Разрабатываемые экологически безопасные приемы борьбы с патогенами с использованием биопестицидов рассматриваются как перспективная альтернатива полной или частичной замены химических соединений [8]. Использование бактерий, стимулирующих рост растений (Plant Growth

Promoting Bacteria, PGPB), является одним из экологически безопасных подходов к устойчивому развитию сельского хозяйства [1, 9–11].

Виды *Bacillus* являются одними из наиболее изученных бактерий, которые способствуют подавлению патогенов растений, включая такие механизмы, как конкуренция за питательные вещества и пространство, производство антибиотиков, гидролитических ферментов, сидерофоров и/или индукция системной устойчивости. *Bacillus spp.* также могут выступать в качестве биоудобрений, способствуя поглощению определенных элементов питания из окружающей среды, либо биостимуляторов, обеспечивая растение биологически активными соединениями (биосинтез растительных гормонов) [9, 11–13]. Бактериальные препараты также могут быть использованы для защиты различных видов растений от вирусных заболеваний [14, 15]. Однако различные вещества и факторы окружающей среды могут негативно влиять на рост бактерий *Bacillus* и производство ими спор и метаболитов [12–14]. Необходим поиск способов преодоления существующих ограничений, связанных с использованием штаммов полезных микроорганизмов, например, путем косвенной поддержки их жизнедеятельности. Показано, что хитозан может выступать в качестве сигнальных молекул для связи между PGPR и корнями растений, а в некоторых случаях инициировать защиту от вирусной инфекции [16]. Противовирусная активность хитозана в растениях ранее доказана в работах [17, 18]. Также показано, что хитозан может быть использован для повышения биологической активности микробиологических препаратов на основе штаммов рода *Bacillus* [16, 19, 20]. Существуют и трудности включения хитозана в бактериальные культуральные среды, так как он может ингибировать рост бактерий за счет собственной антимикробной активности [12, 21]. Одним из способов преодоления негативных последствий добавления хитозана в бактериальные препараты может быть его модификация. Фенольные соединения участвуют в защите растений от биотических стрессов. Растения отвечают на атаку патогенов накоплением таких фитоалексинов, как гидроксикумарины и конъюгаты гидроксициннамата. Синтез, высвобождение и накопление фенольных веществ, в частности салициловой кислоты, являются центральными звеном многих защитных стратегий от патогенов [22]. Было показано, что конъюгация хитозана и кофейной кислоты (**Хит-КК**) позволяет получать материалы с улучшенными свойствами: антиоксидантными, антимикробными, ростостимулирующими и др. [23]. Отмечен значительный ростостимулирующий эффект обработки семян огурца и ячменя конъюгатами на основе хитозана и гидроксикоричных кислот [24, 25]. Совместная обработка *Bacillus subtilis* и конъюгатов хитозана с гидроксикоричными кислотами стимулировала защитные

реакции растений картофеля против возбудителя фитофтороза картофеля [20]. Однако роль конъюгатов Хит-КК в защите растений от абиотических стрессов или подавлении вирусной инфекции остается неизвестной. Кроме того, нет информации о способности смесей конъюгатов Хит-КК и бактериальных агентов стимулировать устойчивость растений к вирусным заболеваниям.

Цель работы — изучение потенциала конъюгатов Хит-КК в смеси с *Bacillus subtilis* 47 для защиты растений картофеля от Y-вируса при оптимальном увлажнении и в условиях водного дефицита в почве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения. Для работы использовали размноженные *in vitro* безвирусные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Бриз белорусской селекции, полученные из Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству (Республика Беларусь).

Бактерии. Использовали грамположительный аэробный штамм *Bacillus subtilis* 47 ВІМ В-859D, торговая марка “Карфил” из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов.

Антимикробная активность. Антимикробную активность конъюгата Хит-КК определяли в отношении штамма *B. subtilis* 47 как описано в работе [26]. В чашки Петри вносили 15 мл ГМФ-агара и 100 мкл тестируемой бактериальной культуры *B. subtilis* 47 с концентрацией клеток 1×10^9 КОЕ/мл. На поверхность засеянного агара помещали стерильные диски диаметром 6 мм, пропитанные растворами конъюгата в концентрациях 0.0125, 0.025, 0.05 мг/мл (№2–4), хитозана в концентрации 0.1 мг/мл (№5) и нанокмпозитов на основе хитозана (№6–8), которые не обсуждаются в данной статье. Инкубацию вели при температуре 25°C в течение суток, после чего наличие антибактериального эффекта исследуемых соединений оценивали по диаметру зон ингибирования роста бактерий вокруг дисков.

Y-вирус картофеля и инфицирование растений. Изолят Y-вируса (YVK) был получен из инфицированных растений картофеля в Научно-практическом центре Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству в 2023 г. Вирус поддерживали путем размножения инфицированных растений картофеля с помощью мини-клубней в защищенном от насекомых биотехнологическом комплексе при температуре 20–21°C, освещенности 12000 люкс и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь).

Искусственное заражение YVK проводили путем нанесения сока инфицированных растений-доноров (200 мкл/лист) на механически поврежденные с помощью мелкозернистой наждачной бумаги

листья 3 и 4 уровней экспериментальных растений. Для получения сока зараженные УВК листья растирали в фосфатном буфере (рН 7.8).

Получение конъюгата хитозана с кофейной кислотой. Конъюгат хитозана с кофейной кислотой (Хит-КК) получали карбодиимидным методом [26]. Для синтеза конъюгата использовали 30 кДа олигомеры хитозана (степень деацетилирования 98.3%, степень полимеризации ~186) производства “Glentham Life Sciences” (Великобритания), кофейную кислоту (КК, “Chem-Impex, Intl Inc.”, США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (EDC), “Sigma-Aldrich”, (Германия). EDC и КК использовали в соотношении 3 : 1. Конъюгат синтезирован в массовом соотношении Хит-КК = 5 : 1. Синтезированный конъюгат Хит-КК очищали методом диализа с использованием целлюлозной диализной трубки с размером пор 14 кДа (“Sigma D9277-100FT” и “Sigma D9652-100FT”, США) против дистиллированной воды в течение 1 сут. Конъюгат лиофилизировали с помощью лиофильной сушилки Freezone 1.0 “Labconco”, (США) при – 47°C и 0.03 мбар в течение 16 ч и хранили в виде лиофилизата.

Содержание КК в синтезированном конъюгате определяли спектрофотометрически по поглощению в диапазоне 200–400 нм “Specord-50” (Германия). Содержание КК рассчитывали по предварительно построенной калибровочной кривой. Степень присоединения КК к хитозану составила $5.0 \pm 0.6\%$ или 53.8 ± 7.2 мкг/мг хитозана.

Схема эксперимента. Размножение растений картофеля *in vitro* проводили на агаризованной среде MS. Адаптацию полученных пробирочных растений к условиям *ex vitro* проводили в контейнерах на 4 л, по три штуки на вариант, по девять растений на контейнер, на торфяном почвогрунте “Универсальный” (Республика Беларусь) с добавлением минеральных удобрений. Растения выращивали в защищенной от насекомых теплице при температуре 20–21°C, освещенности 12 000 люкс и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в течение 3 недель. Затем опрыскивали поверхность листьев смесью *B. subtilis* 47 в концентрации 1×10^7 КОЕ и конъюгатом Хит-КК в концентрации 0.025 мг/мл или отдельно только конъюгатом Хит-КК в концентрации 0.025 мг/мл. Инфицирование растений УВК проводили через 3 дня после обработки исследуемыми смесями.

Моделирование водного дефицита. Создание водного дефицита почвы начинали через 3 сут после заражения листьев УВК и продолжали в течение 3 месяцев до появления мини-клубней. Водный дефицит создавали за счет сокращения полива растений (40–45% влажности почвогрунта от наименьшей влагоемкости, после стекания гравитационной воды). В контроле растения выращивали при оптимальной влажности 80–85% от наименьшей влагоемкости торфогрунта. Регулирование

оптимальной влажности торфогрунта и условий водного дефицита проводили весовым методом, а также с помощью влагомера TR 001 (Китай).

Оводненность тканей листьев определяли весовым методом: растительные образцы выдерживали в термостате до постоянного веса при температуре 105°C и высчитывали по формуле: $(a - b) / a \times 100$, где a – сырая масса; b – абсолютно сухая масса.

Выявление УВК методом ИФА. Контроль за накоплением УВК выполняли с помощью метода ИФА “сэндвич-вариант” (методом двойного наложения антител), тест-системой с пероксидазной ферментативной меткой (Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха РАСХН) в строгом соответствии с прилагаемым протоколом проведения анализа. Оптическую плотность продуктов ферментативной реакции измеряли на фотометре ИФА-анализатор В-300 “Витязь” (Беларусь) при $\lambda = 492$ нм.

Для определения степени инфицирования УВК методом ИФА и биохимических исследований через 14 сут после заражения собирали по 2–3 сформированных листа без признаков заболевания в верхнем ярусе над инфицированными листьями с симптомами повреждения.

Биохимические исследования. Количественную оценку биохимических показателей проводили с помощью спектрофотометра “Jasco V-630” (Япония). Содержание белка в экстракте определяли по методу Брэдфорда.

Определение содержания перекиси водорода (H_2O_2). Свежие листья 0.2 г гомогенизировали в 600 мкл 25 мМ Na-фосфатного буфера (рН 6.2) и центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g. Содержание H_2O_2 в растениях определяли с помощью ксиленового оранжевого. Оптическую плотность продукта определяли при 560 нм [27]. Концентрацию H_2O_2 определяли по калибровочной кривой и выражали в мкмоль/г сырой массы.

Определение содержания пролина. Общее содержание пролина определяли по методике Бейтса с соав. с изменениями [28]. Листья массой 0.3 г гомогенизировали в 3%-ной сульфосалициловой кислоте и центрифугировали 15 мин при 12000g. К аликвоте надосадочной жидкости добавляли ледяную уксусную кислоту и нингидриновый реактив в соотношении 1 : 1 : 1 и нагревали 60 мин при 90°C на термошейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин). Оптическую плотность измеряли при длине волны 515 нм. Содержание пролина в каждом образце определяли по калибровочной кривой и выражали в мг/г сырой массы.

Определение общего содержания фенольных соединений. Общее содержание фенольных соединений (ФС) в листьях определяли по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси [29]. Листья массой 0.2 г экстрагировали последовательно

дважды в 10 мл 70%-ного этанола в термошейкере при постоянном перемешивании (300 об./мин) при 90°C в течение 45 мин, полученные экстракты объединяли. Для определения содержания ФС к 0.1 мл экстракта образца добавляли 0.8 мл раствора карбоната натрия и реактив Фолина–Чокальтеу (1 мл), перемешивали встряхиванием и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Измеряли абсорбцию при 765 нм по отношению к реакционной смеси без образца экстракта. Содержание фенольных соединений выражали в мкг-экв. хлорогеновой кислоты в 1 г сырой массы.

Определение активности полифенолоксидазы. Активность полифенолоксидазы (ПФО, ЕС 1.10.3.2) определяли спектрофотометрическим методом, основанном на измерении оптической плотности продуктов реакции, которые образуются при окислении катехола за определенный промежуток времени согласно Кумар с соавт. [30]. Активность фермента рассчитывали в условных единицах (ΔD_{560}) в мин/мг белка.

Активность общей пероксидазы (ПО, ЕС 1.11.1.7). Активность определяли по методу [31], основанном на окислении субстрата 0.01%-ного уксуснокислого бензидина и 0.3%-ного пероксида водорода. Активность фермента рассчитывали в условных единицах (ΔD_{590}) в мин/мг белка.

Активность супероксиддисмутазы (СОД, ЕС 1.15.1.1) измеряли как описано в работе [32]. Поглощение раствора измеряли при 560 нм. За единицу активности принимали $U = (D_{15} - D_0)/D_0 \times 100\%$, где D_0 – оптическая плотность приготовленной смеси, D_{15} – оптическая плотность через 15 мин. За единицу активности принимали количество фермента, способного ингибировать реакцию восстановления нитросинего тетразолия на 50%. Активность СОД выражали в условных единицах на 1 мг белка.

Активность аскорбатпероксидазы (АПО, ЕС 1.11.1.11) определяли, регистрируя снижение абсорбции при 290 нм в результате окисления аскорбата по методу, приведенному в [33]. За единицу активности АПО принимали количество фермента, которое окисляло 1 нмоль аскорбата в мин на мг белка.

Определение активности глутатионредуктазы. Активность глутатионредуктазы (ГР, ЕС 1.8.1.7) определяли по методике [34]. Кинетику потребления НАДФН регистрировали при 340 нм. Активность фермента рассчитывали по коэффициенту молярной экстинкции, который составляет $6.2 \text{ mM}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. За 1 единицу активности ГР принимали убыль 1 нмоль НАДФН за 1 ч.

Биохимические исследования проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях.

Статистический анализ. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistics 22. Для оценки распределения использовали тест Колмогорова–Смирнова.

Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты представлены в виде $M \pm CI$ (где M – среднее значение, CI – доверительный интервал). Критический уровень значимости составлял $p < 0.05$. Достоверные различия между вариантами на рисунках и таблицах отмечены разными буквами латинского алфавита, одинаковые буквы на разных столбцах диаграмм и в надстрочных подписях над значениями в таблицах обозначают отсутствие достоверных различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что многие соединения хитозана обладают антимикробной активностью и при включении в бактериальные культуральные среды могут ингибировать рост бактерий [14, 21]. В связи с этим изучена антибактериальная активность конъюгата Хит-КК по отношению к штамму *B. subtilis* 47 для оценки совместимости компонентов смеси. Антибактериальную активность соединения оценивали по образованию зон ингибирования роста бактерий. Установлено, что в концентрациях от 0.0125 мг/мл до 0.05 мг/мл (диски 2, 3, 4) конъюгат Хит-КК и отдельно хитозан в концентрации 0.1 мг/мл (диск 5) не проявляют антимикробной активности к штамму *B. subtilis* 47, так как вокруг зон нанесения конъюгата и хитозана не наблюдалось ингибирования роста бактерий (рис. 1).

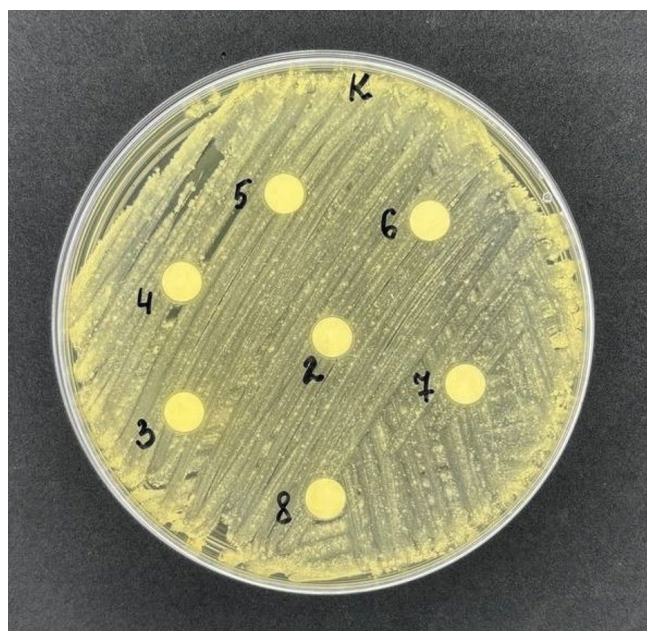


Рис. 1. Результаты оценки антибактериальной активности Хит-КК и хитозана в отношении штамма *Bacillus subtilis* 47: К – штамм *Bacillus subtilis* 47 (Кар-фил); 2 – Хит-КК 0.0125 мг/мл; 3 – Хит-КК 0.025 мг/мл; 4 – Хит-КК 0.05 мг/мл; 5 – хитозан 0.1 мг/мл; 6, 7, 8 – нанокomпозиты на основе хитозана.

Вирусные заболевания и недостаток влаги в почве являются одними из основных проблем, вызывающих потерю урожайности и ухудшение качества картофеля. Использование бактерий рода *Bacillus*, повышающих засухоустойчивость растений, и модифицированного хитозана, способного усиливать и модулировать иммунный ответ растений на вирусные инфекции, является возможным решением обозначенных проблем.

Результаты ИФА продемонстрировали, что обработка растений конъюгатом Хит-КК снижала степень инфицирования листьев картофеля на $24 \pm 2,0\%$ и $17 \pm 0,9\%$ в условиях оптимального и недостаточного увлажнения почвы соответственно. Совместная обработка Хит-КК и *B. subtilis* 47 не влияла на степень инфицирования растений УВК при оптимальном увлажнении, но в условиях дефицита влаги применение Хит-КК совместно с *B. subtilis* 47 снижало уровень заражения на 9.1% (рис. 2).

Влияние вирусного заражения и водного стресса на водный обмен было оценено по показателю оводненности тканей. Содержание воды в листьях незначительно снижалось при водном почвенном дефиците или заражении растений УВК. Комбинированный стресс вызвал уменьшение содержания воды в тканях листьев картофеля на 6% по сравнению с контрольными растениями в оптимальных условиях увлажнения. У растений, обработанных Хит-КК, содержание воды не отличалось от контрольных во всех условиях опыта. Обработка смесью Хит-КК + *B. subtilis* 47 в условиях водного дефицита, особенно при инфицировании, приводила к максимальному в эксперименте (на 9% по отношению к оптимальному контролю) снижению оводненности в тканях (табл. 1).

Накопление пролина – важный показатель состояния растений при действии осмотического стресса. Дополнительный синтез этой аминокислоты повышает общую устойчивость растений к абиотическим стрессам. Существуют свидетельства, что пролин может выступать в качестве метаболического сигнала, регулирующего окислительно-восстановительный гомеостаз и экспрессию некоторых генов стрессового ответа [35]. Показано, что инокуляция растений эндофитными штаммами *B. subtilis* приводила к накоплению пролина [20].

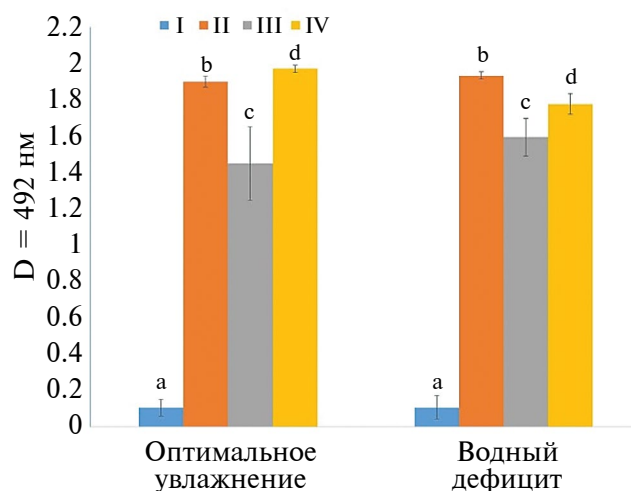


Рис. 2. Степень инфицирования УВК листьев картофеля без обработки (II), после обработки Хит-КК (III) и смесью Хит-КК и *B. subtilis* 47 (IV): I – контроль – незараженные растения.

Как показали эксперименты, применение Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 увеличивало содержание пролина в среднем на $14 \pm 0.7\%$ по отношению к контрольным растениям в оптимальных условиях увлажнения и на $25.4 \pm 1.4\%$ и $62.6 \pm 5\%$ соответственно при дефиците почвенной влаги. Заражение растений УВК при нормальной влажности почвы приводило к увеличению содержания пролина, но в обработанных Хит-КК и инфицированных растениях его количество оставалось на уровне здоровых растений. На фоне дефицита почвенной влаги инфицирование УВК увеличивало накопление пролина в 2.1 раза. При этом выявлено снижение содержания пролина в обработанных Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 растениях при инфицировании УВК на 15.5% и 11.5% соответственно по сравнению с контрольными растениями (рис. 3а).

Обработки Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 повышали содержание фенольных соединений (ФС) в здоровых растениях на 13.2–13.6% и увеличивали активность ПФО на 9.2% и 17.9% по сравнению с контролем в оптимальных условиях увлажнения. При недостатке влаги содержание ФС в обработанных Хит-КК оставалось на уровне контрольных

Таблица 1. Влияние УВК и смеси Хит-КК+*B. subtilis* 47 на оводненность (%) тканей листьев картофеля при оптимальных условиях увлажнения и водном дефиците в почве

Показатель	Здоровые растения		Инфицированные УВК растения	
	оптимальное увлажнение	водный дефицит	оптимальное увлажнение	водный дефицит
Контроль	88.6 ± 0.75^a	86.3 ± 0.72^b	86.2 ± 1.14^b	83.3 ± 1.05^d
Хит-КК	88.3 ± 0.57^a	86.5 ± 0.98^{bc}	86.3 ± 0.49^b	81.9 ± 1.12^{dc}
Хит-КК+ <i>B.subtilis</i> 47	87.8 ± 0.72^{ac}	84.0 ± 1.01^d	85.7 ± 0.43^b	80.7 ± 1.44^e

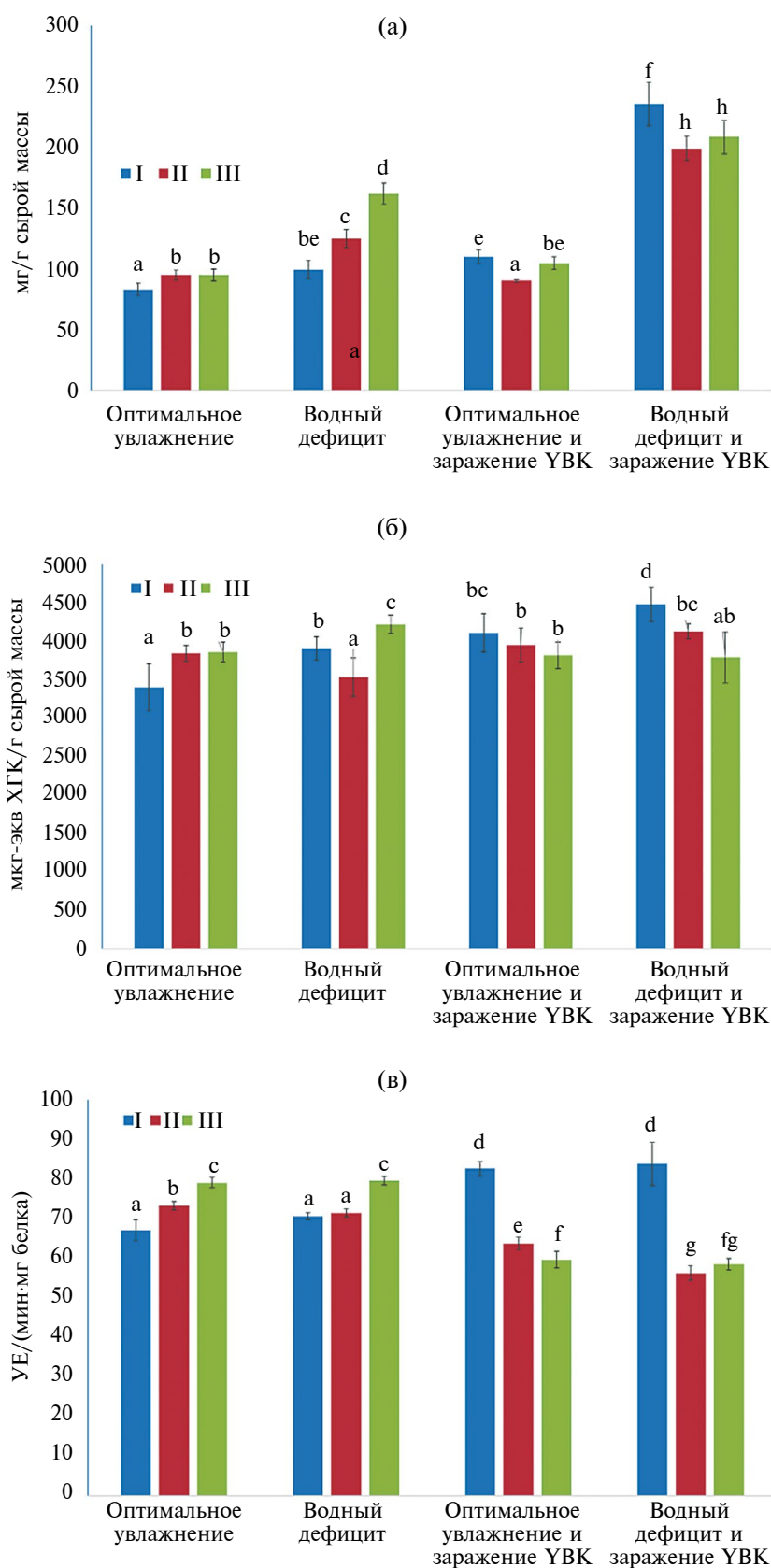


Рис. 3. Влияние обработок (I–III) на содержание пролина (а), содержание фенольных соединений (б) и активность ПФО (в) в листьях здоровых и зараженных YBK растений картофеля в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците в почве: I – контроль; II – обработка Хит-КК; III – обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47.

растений с оптимальным увлажнением, а в варианте Хит-КК + *B. subtilis* 47 содержание ФС увеличились на $9.5 \pm 0.6\%$ и отмечен рост активности ПФО по сравнению необработанными растениями. Заражение УВК как при оптимальном увлажнении, так и в условиях водного дефицита, привело к значительному увеличению содержания ФС и активации ПФО, но под влиянием Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 содержание ФС снижалось. Так, на фоне водного стресса в обработанных Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 и зараженных УВК листьях, уровень ФС был на 7,8 и 15,4% ниже по сравнению с необработанным контролем (рис. 3б), а активность ПФО снизилась на 23–28% при применении Хит-КК и 30–32% при использовании смеси (рис. 3в).

Накопление низкомолекулярных полифункциональных соединений, таких как пролин и фенольные соединения, активация ПФО при обработке здоровых растений картофеля при оптимальных условиях почвенного увлажнения позволяет предположить, что Хит-КК и смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 могут играть роль сигнальных соединений, мобилизирующих защитные системы и повышающих неспецифическую устойчивость. Индукция у растений реакций устойчивости, вызванная Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47, обуславливает впоследствии антистрессовый эффект и снижение негативного влияния совместного воздействия патогена и засухи, что отражается в снижении активированных стрессом синтеза пролина и фенольных соединений в обработанных растениях.

Учитывая, что формирование защитного ответа на инфицирование определяется на ранних этапах патогенеза, важно выяснить влияние производных хитозана в комплексе с бактериями *B. subtilis* 47 на состояние про-/антиоксидантной системы растений. Известно, что хитин, хитозан и их олигомеры являются активными элиситорами иммунитета растений, в том числе, за счет регуляции редокс-статуса растительных клеток [36, 37]. Производные гидроксикоричной кислоты обладают ярко выраженными антиоксидантными свойствами [30], снижая образование активных форм кислорода за счет нейтрализации свободных радикалов [38] и активации антиоксидантных ферментов [39]. Ранее было показано, что пришивка фенольной кислоты усиливает антиоксидантную и антибактериальную активность в конъюгации с хитозаном [40]. Способность *B. subtilis* самостоятельно активировать некоторые антиоксидантные ферменты, снижать содержание малонового диальдегида (МДА) и H_2O_2 показана в работе [41].

Обработка конъюгатом Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 в оптимальных условиях увлажнения приводила к снижению содержания пероксида водорода на 9% в здоровых растениях картофеля. Обработка смесью бактерий с конъюгатом Хит-КК в

условиях дефицита влаги в почве приводила к достоверному снижению содержания H_2O_2 на 17,5%. Заражение растений УВК вызывало снижение уровня H_2O_2 у растений, выращенных при оптимальной (на 24%) и недостаточной влажности почвы (на 38%), по сравнению с контрольными растениями. Конъюгат Хит-КК не изменял содержание пероксида, а смесь вызвала его снижение на 23,7% по сравнению с инфицированным контролем. У растений, испытывающих водный стресс и заражение УВК, обработка конъюгатом Хит-КК увеличивала содержание H_2O_2 на 20,2%, а обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47 не вызвала изменений по сравнению с инфицированным контролем (рис. 4а).

Изменение концентрации H_2O_2 в тканях растений в процессе патогенеза может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности антиоксидантных ферментов [42].

Одним из важных ферментов антиоксидантной системы растений, участвующих в утилизации АФК, является СОД. Эффективное функционирование СОД во многом определяется функционированием других компонентов защитных систем, в частности, утилизирующих пероксид водорода (каталазы, пероксидазы, ферментов аскорбат-глутатионового цикла).

Применение Хит-КК не изменило активность СОД, но активность фермента снизилась у здоровых растений, обработанных Хит-КК + *B. subtilis* 47 в оптимальных условиях влажности почвы. Водный дефицит вызывал снижение активности СОД у необработанных растений, однако обработка Хит-КК и особенно Хит-КК + *B. subtilis* 47 активировали СОД у здоровых растений. Заражение растений УВК при оптимальном увлажнении и при водном дефиците незначительно снижало активность СОД у растений, обработанных Хит-КК по сравнению с соответствующим контролем. Смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 значительно снижала активность СОД по сравнению с инфицированными контрольными растениями при оптимальном увлажнении и не изменяла активности СОД в сравнении с применением Хит-КК и инфицированными растениями в условиях водного дефицита (рис. 4б).

При применении Хит-КК и Хит-КК + *B. subtilis* 47 активность ПО снизилась у здоровых растений в оптимальных условиях увлажнения. Водный дефицит вызывал снижение активности у необработанных растений, но Хит-КК и особенно Хит-КК + *B. subtilis* 47 активировали ПО у здоровых растений в данных условиях выращивания.

Заражение растений УВК при оптимальном увлажнении снизило активность ПО по сравнению со здоровыми растениями. Применение Хит-КК активировало ПО на 26,5%, Хит-КК + *B. subtilis* 47 значительно снижали активность ПО как по сравнению с инфицированными контрольными, так и здоровыми растениями. Активность ПО не

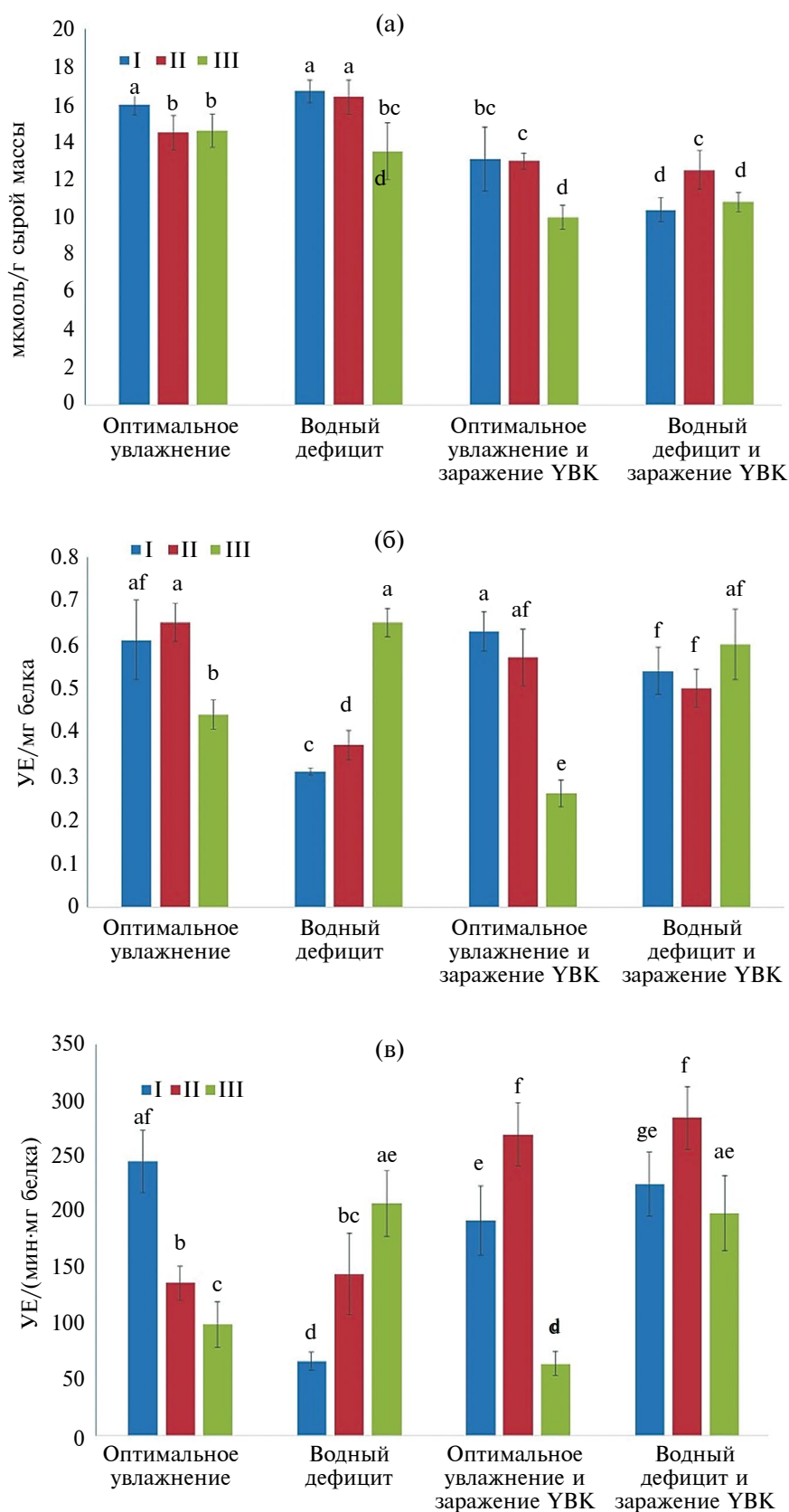


Рис. 4. Влияние обработок (I–IV) на содержание пероксида водорода (а), активность СОД (б) и активность пероксидазы (в) в листьях здоровых и зараженных YBK растений картофеля в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците в почве: I – контроль; II – обработка Хит-КК; III – обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47.

изменилась у инфицированных необработанных растений в условиях водного дефицита, но увеличивалась при воздействии Хит-КК на инфицированные растения. Применение смеси бактерий и Хит-КК снижало активность ПО в сравнении с применением Хит-КК и инфицированными растениями в условиях водного дефицита (рис. 4в).

Обработка Хит-КК снижала активность АПО и ГР у здоровых растений в оптимальных условиях увлажнения, а смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47, напротив, повышала активность ГР и АПО. Недостаточное почвенное влагообеспечение вызывало повышение активности ГР и снижение активности АПО у неинфицированных растений. Обе обработки снижали

активность АПО, Хит-КК повышал активность ГР, а Хит-КК + *B. subtilis* 47 не оказывали существенного влияния на эти показатели при водном дефиците. Инфицирование растений значительно повышало активность АПО и ГР по сравнению со здоровыми растениями как в оптимальных, так и в стрессовых условиях. Применение Хит-КК повышало активность АПО и ГР на 27,2% и в 2,3 раза соответственно относительно инфицированного контроля, но Хит-КК + *B. subtilis* 47 значительно снижали эти показатели. В условиях вирусного заражения и водного дефицита в случае применения Хит-КК выявлена тенденция к снижению АПО и ГР, а смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 снижала АПО, но увеличивала ГР (рис. 5а, б).

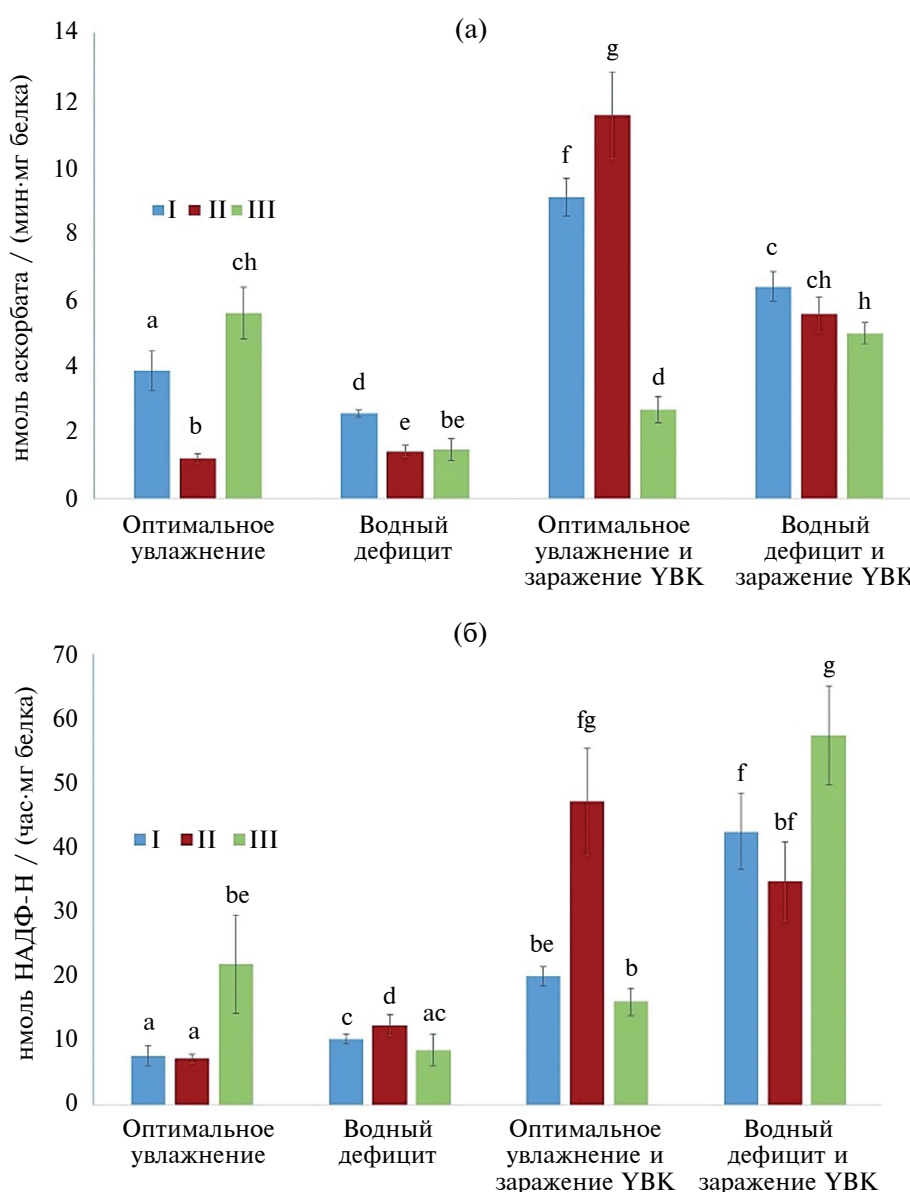


Рис. 5. Влияние обработок (I–III) на активность АПО (а) и ГР (б) в листьях здоровых и зараженных YBK растений картофеля в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците в почве: I — контроль; II — обработка Хит-КК; III — обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47.

Таким образом, в условиях водного дефицита уровень пероксида водорода не изменился у здоровых растений, обработанных конъюгатом Хит-КК, но был заметно ниже у растений, обработанных Хит-КК + *B. subtilis* 47 (рис. 4а), что сопровождалось накоплением пролина и ФС, активацией СОД, ПО, ПФО, но снижением активности АПО.

Через 14 дней после заражения в ярусе листьев растений, расположенном над инокулированными УВК листьями, была установлена положительная реакция на вирус. В листьях регистрировали снижение уровня пероксида водорода по сравнению со здоровыми растениями. Максимальное снижение наблюдалось у растений, подвергшихся комбинированному стрессу, но отмечено значительное накопление низкомолекулярных антиоксидантов и повышение активности ПФО, АПО и ГР было показано как при оптимальном почвенном увлажнении, так и в условиях водного дефицита (рис. 3–5).

Обнаруженное сниженное содержание титра вируса при обработке растений Хит-КК в инфицированных листьях картофеля на 23.7 и 16.3% (рис. 2) в условиях оптимального увлажнения и дефицита влаги в почве соответственно сопровождалось поддержанием пероксида водорода на уровне зараженного контроля в оптимальных условиях или повышением на 20,2% при комбинированном стрессе (рис. 4а). При этом активность СОД оставалась на уровне контроля (рис. 4б), но определяемая активность ПО была выше значений соответствующего контроля (рис. 4в). Авторы [43, 44] указывают, что мобильные формы пероксидаз могут функционировать не только как H_2O_2 -скавенджеры, но и могут катализировать образование АФК, способствующих запуску окислительного стресса при формировании СПУ на воздействие неблагоприятного фактора. Активность АПО и ГР увеличивалась (рис. 5а, б) в зараженных листьях при обработке Хит-КК в оптимальных условиях увлажнения, но в случае комбинированного стресса АПО

и ГР оставались на уровне соответствующего контроля (рис. 5а, б).

В настоящем исследовании смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 была менее эффективна по сравнению с Хит-КК и снижала степень заражения только при дефиците влаги в почве. Обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47 снижала уровень пероксида водорода в зараженных листьях в оптимальных условиях увлажнения, но его значения оставались на уровне соответствующего контроля у обработанных растений, подвергшихся водному дефициту. Смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 в отличие от контроля и обработки только Хит-КК значительно ингибировала активность антиоксидантных ферментов в зараженных растениях при оптимальном увлажнении. Вероятно, низкое содержание пероксида водорода и, вероятно, связанное с этим уменьшение активности СОД, ПО и ферментов аскорбат-глутатионового цикла при воздействии Хит-КК + *B. subtilis* 47 вызвано синергетическим антистрессовым эффектом смеси, ингибирующим образование АФК. Однако снижение H_2O_2 и активности ферментов коррелировало с отсутствием устойчивости у таких растений к вирусному патогену.

Продуктивность обработанных растений картофеля определяли по массе и количеству мини-клубней, полученных в 1 контейнере (табл. 2).

Максимальное количество мини-клубней и их общей массы были получены при обработке растений конъюгатом Хит-КК: увеличение составило 24.1–24.5% и 13.3–13.8% по сравнению с контролем в оптимальных условиях увлажнения и при водном дефиците соответственно. При применении смеси Хит-КК с *B. subtilis* 47 наблюдалась тенденция к увеличению продуктивности, но достоверных различий не установлено. Применение конъюгата Хит-КК на зараженных растениях в оптимальных условиях увлажнения увеличивало массу мини-клубней, но не их количество. Напротив, смесь конъюгата Хит-КК с бактериями

Таблица 2. Влияние УВК и смеси Хит-КК + *B. subtilis* 47 на массу и количество мини-клубней, полученных при оптимальном увлажнении почвы и водном дефиците

Вариант опыта	Здоровые растения		Инфицированные УВК растения	
	оптимальное увлажнение	водный дефицит	оптимальное увлажнение	водный дефицит
Масса мини-клубней, г/ контейнер				
Контроль	151.9 ± 8,9 ^a	62.1 ± 0,9 ^c	138.8 ± 2,7 ^c	64.8 ± 2,61 ^c
Хит-КК	188.5 ± 10,4 ^b	73.4 ± 1,8 ^d	155.5 ± 2,4 ^a	55.1 ± 3,03 ^g
Хит-КК + <i>B. subtilis</i> 47	161.8 ± 9,9 ^a	69.6 ± 4,0 ^d	110.4 ± 7,1 ^f	57.5 ± 3,71 ^g
Количество мини-клубней, шт./ контейнер				
Контроль	37.5 ± 1.5 ^a	39.0 ± 0.60 ^a	35.0 ± 2.0 ^{ad}	32.7 ± 0.9 ^d
Хит-КК	42.5 ± 1.5 ^{bc}	44.0 ± 0.6 ^c	37.7 ± 1.2 ^a	31.3 ± 0.9 ^d
Хит-КК + <i>B. subtilis</i> 47	39.0 ± 1.6 ^a	36.3 ± 1.9 ^a	40.7 ± 1.5 ^{ab}	28.7 ± 1.3 ^c

увеличивала количество мини-клубней, но снижала их массу. При комбинированном стрессе обработка конъюгатом Хит-КК как отдельно, так и в смеси с *B. subtilis* 47 снижала продуктивность мини-клубней картофеля.

Таким образом, обнаружено, что применение Хит-КК значительно снижало уровень инфицированности УВК растений картофеля, выращенных в оптимальных условиях увлажнения и условиях дефицита влаги в почве и способствовало увеличению массы мини-клубней картофеля при оптимальном увлажнении. Поддержание выработки пероксида водорода, изменение уровня пролина и фенольных соединений и активация пероксидазы и ферментов аскорбат-глутатионового цикла под действием Хит-КК может быть решающим фактором поддержания устойчивости растений картофеля к У вирусу. Смесь Хит-КК + *B. subtilis* 47 в исследуемой концентрации не обеспечивала эффективного подавления У-вирусной инфекции в листьях картофеля в условиях оптимальной влажности почвы, что, вероятно, обусловлено низкой активностью компонентов антиоксидантной системы. Она вызывала снижение продуктивности мини-клубней в изучаемых условиях выращивания. Выращивание зараженных растений в условиях водного дефицита приводило к снижению уровня АФК, в то время как обработка Хит-КК + *B. subtilis* 47 минимизировала развитие УВК, вызывая адаптационные изменения в прооксидантно-антиоксидантном равновесии растительной клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-16-00139.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Данная статья не содержит исследований с участием животных или людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saeed Q., Xiukang W., Haider F.U., Kučerik J., Mumtaz M.Z., Holatko J., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 10529. <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
2. Vilvert E., Stridh L., Andersson B., Olson Å., Aldén L., Berlin A. // Environmental Evidence. 2022. V. 11. № 6. P. 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13750-022-00259-x>
3. Ramegowda V., Senthil-Kumar M. // J. Plant Physiol. 2015. V. 176. P. 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>
4. Zhang H., Sonnewald U. // The Plant Journal. 2017. V. 90. P. 839–855. <https://doi.org/10.1111/tjp.13557>
5. Hamooh B.T., Sattar F.A., Wellman G., Mousa M.A.A. // Plants. 2021. V. 10. P. 98. <https://doi.org/10.3390/plants10010098>
6. Rubio L., Galipienso L., Ferriol I. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1092. <https://doi.org/doi:10.3389/fpls.2020.01092>
7. Jones R.A. // Plants. 2021. V. 10. P. 233. <https://doi.org/10.3390/plants10020233>
8. Riseh R.S., Hassanisaadi M., Vatankhah M., Babaki S.A., Barka E.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 220 P. 998–1009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.109>
9. Shah A., Nazari M., Antar M., Msimbira L.A., Naamala J., Lyu D., et al. // Front. Sustain. Food Syst. 2021. V. 5. P. 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>
10. Vurukonda S.S.K.P., Vardharajula S., Shrivastava M., SkZ A. // Microbiological Research. 2016. V. 184. P. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
11. Maksimov I.V., Abizgil'dina R.R., Pusenkova L.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 4 P. 333–345. <https://doi.org/10.1134/S0003683811040090>
12. Miljaković D., Marinković J., Balešević-Tubić S. // Microorganisms. 2020. V. 8. № 7. P. 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
13. Yarullina L.G., Kalatskaja J.N., Cherepanova E.A., Yalousskaya N.A., Tsvetkov V.O., Ovchinnikov I.A., et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. № 5. P. 549–560. <https://doi.org/10.1134/s0003683823050186>
14. Maksimov I.V., Singh B.P., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Khairullin R.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 1. P. 15–28. <https://doi.org/10.1134/s0003683820010135>
15. Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Rumyantsev S.D., Cherepanova E.A., Alekseev V.Y., et al. // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 288. <https://doi.org/doi:10.3390/biom12020288>
16. Amine R., Tarek C., Hassane E., Nouredine E.H., Khadija O. // Molecules. 2021. V. 26. № 4. P. 1117. <https://doi.org/10.3390/molecules26041117>
17. Chirkov S.N. // Appl. Biochem. Microbiol. 2002. V. 38. № 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1023/A:1013206517442>
18. He X., Xing R., Liu S., Qin Y., Li K., Yu H., Li P. // Drug and Chemical Toxicology. 2019. V. 44. № 4. P. 335–340.
19. Novikova I.I., Popova E.V., Krasnobaeva I.L., Kovalenko N.M. // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya (Agricultural Biology). 2021. V. 56. P. 511–522.
20. Yarullina L.G., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Sorokan A.V., Zaikina E.A., Tsvetkov V.O., et al. // Microorganisms. 2023. V. 11. № 8. P. 1993. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081993>

21. Dutta J., Tripathi S., Dutta P.K. // Food Science and Technology International. 2012. V.18. №1. P.3–34. <https://doi.org/doi:10.1177/1082013211399195>
22. Kumar S., Abedin M.M., Singh A.K., Das S. // Plant Phenolics in Sustainable Agriculture. 2020. V. 1. P. 517–532. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22
23. İlyasoğlu H., Guo Z. // Food Bioscience. 2019. V. 29. P. 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.04.007>
24. Nedved E.L., Kalatskaja J.N., Ovchinnikov I.A., Rybinskaya E.I., Kraskouski A.N., Nikalaichuk V.V., et al. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 1. P. 69–76. <https://doi.org/10.1134/s0003683822010069>
25. Nikalaichuk V., Hileuskaya K., Kraskouski A., Kulikouskaya V., Nedved H., Kalatskaja J., et al. // J. Appl. Polym. Sci. 2021. V. 139. № 14. P. 51884. <https://doi.org/10.1002/app.51884>
26. Tenover F.C. // Eds Th. M. Schmidt. Encyclopedia of Microbiology. Academic Press. 2019. P. 166–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02486-7>
27. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. // New Phytol. 2001. V. 151. P. 185–194.
28. Bates L.S., Waldren R.P., Teare J.D. // Plant and Soil. 1973. V. 39. № 1. P. 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
29. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. // Methods in Enzymology. 1999. V. 299. P. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
30. Kumar V.B.A., Kishor T.C.M., Murugan K. // Food Chemistry. 2008. V. 110 № 2. P. 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.006>
31. Boyarkin A.N. Determination of Peroxidase Activity. / Ed. A.L. Ermakov, Leningrad: Kolos, 1987. P. 41–43.
32. Beyer W.F., Fridovich I. // Anal. Biochem. 1987. V. 161. № 2. P. 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
33. Nakano Y. Asada K. // Plant Cell Physiol. 1981. V. 22. № 5. P. 867 – 880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
34. Aono M., Kubo A., Saji H. // Plant Cell Physiol. 1991. V. 32. № 5. P. 691–697. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078132>
35. Тарчевский И.А., Егорова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 4. С. 315–329. <https://doi.org/10.31857/s055510992204016x>
36. Jia X., Rajib M., Yin H. // Current Pharmaceutical Design. 2020. V. 26. № 29. P. 3508–3521. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200617165915>
37. Chakraborty M., Hasanuzzaman M., Rahman M., Khan Md., Bhowmik P., Mahmud N.U., et. al. // Agriculture. 2020. V. 10. № 12. P. 624. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120624>
38. Siquet C., Paiva-Martins F., Lima J.L., Reis S., Borges F. // Free Radic. Res. 2006. V. 40. P. 433–442. <https://doi.org/10.1080/10715760500540442>
39. Rivero R.M., Ruiz J.M., Garcia P.C., Lopez-Lefebvre L.R., Sanchez E., Romero L. // Plant Sci. 2001. V. 160. P. 315–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00395-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00395-2)
40. Yang X., Lan W., Lu M., Wang Z., Xie J. // LWT. 2022. V. 170. P. 114072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114072>
41. Maslennikova D., Lastochkina O. // Plants. 2021. V.10. № 12. P. 2557. <https://doi.org/10.3390/plants10122557>
42. Smirnoff N., Arnaud D. // New Phytologist. 2019. V. 221. № 3. P. 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
43. Минибаяева Ф.В., Гордон Л.Х. // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 3. С. 459–464.
44. Hernández J.A., Gullner G., Clemente-Moreno M.J., Künstler A., Juhász C., Díaz-Vivancos P., et.al. // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2016. V. 94. P. 134–148. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.09.001>

Effect of Chitosan-Caffeic Acid Conjugate and *Bacillus subtilis* Bacteria on the Protective Reactions in PVY-Infected Plants Under Soil Water Deficit

J. N. Kalatskaja^{a, *}, L. G. Yarullina^b, N. A. Yalousskaya^a, G. F. Burkhanova^b,
E. I. Rybinskaya^a, E. A. Zaikina^b, I. A. Ovchinnikov^a, V. O. Tsvetkov^c, K. M. Herasimovich^a,
E. A. Cherepanova^b, O. A. Ivanov^a, K. S. Hileuskaya^d, and V. V. Nikalaichuk^d

^a*V.F. Kuprevich Institute of Experimental Botany, the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, 220072 Republic of Belarus*

^b*Institute of Biochemistry and genetics - separate structural subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

^c*Ufa University of Science and Technology, Ufa, 450076 Russia*

^d*Institute of Chemistry of New Materials, the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, 220141 Republic of Belarus*

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

The effect of chitosan-caffeic acid (**Ch-CA**) conjugate separately and in combination with a mixture of *Bacillus subtilis* 47 on the plant defense against PVY under optimal hydration and water deficit in soil was evaluated. The treatments of Ch-CA and Ch-CA+*B. subtilis* 47 on healthy potato plants under optimal soil moisture conditions demonstrated the accumulation of proline and phenolic compounds, as well as the activation of PPO, which collectively led to an increase in the nonspecific plant defenses. The application of Ch-CA resulted in a reduction of PVY infection in potato plants grown under both optimal and soil moisture-deficient conditions and led to an increase the potato mini-tuber's mass. The combination of *B. subtilis* 47 and Ch-CA proved effective in reducing the infection level exclusively under conditions of soil water deficit. It has been demonstrated that the primary factor influencing the development of resistance in potato plants to PVY under moisture-limiting conditions is associated with an elevated peroxidase activity and alterations in antioxidant activity within plant tissues.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., Potato virus Y (PVY), *Bacillus subtilis* 47, conjugate, caffeic acid, soil water deficiency, pro-/antioxidant system, productivity of mini-tubers

УДК 582.949.2+547.814.5+615.214.32

НОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ АКАЦЕТИНА И ДРУГИЕ ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ *Agastache foeniculum* И ИХ ВЛИЯНИЕ НА МОНОАМИНОКСИДАЗЫ А И В

© 2024 г. Д. Н. Оленников^{1, *}, Н. И. Кашенко¹

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Поступила в редакцию 29.12.2023 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Ингибиторы моноаминоксидаз (МАО) являются эффективными терапевтическими средствами для лечения нейродегенеративных заболеваний. К их числу относятся флавоноиды, обнаруженные в видах *Agastache*. В ходе настоящего исследования из *A. foeniculum* было выделено и идентифицировано с применением УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии шесть новых ацилированных флавоно-*O*-гликозидов — агастозидов А (акацетин 7-*O*-(2"-*O*-малонил)-β-*D*-глюкопиранозид), В (акацетин 7-*O*-(4"-*O*-малонил)-β-*D*-глюкопиранозид), С (акацетин 7-*O*-(2",6"-ди-*O*-малонил)-β-*D*-глюкопиранозид), D (акацетин 7-*O*-(4",6"-ди-*O*-малонил)-β-*D*-глюкопиранозид), Е (акацетин 7-*O*-(2"-*O*-малонил-6"-*O*-ацетил)-β-*D*-глюкопиранозид) и F (акацетин 7-*O*-(4"-*O*-ацетил-6"-*O*-малонил)-β-*D*-глюкопиранозид). Использование флэш-хроматографии и жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии позволило обнаружить еще 34 известных фенольных соединения. Исследование биологической активности показало, что гликозиды акацетина из *A. foeniculum* оказывали ингибиторное действие на МАО, причем наибольший эффект был отмечен для ацетильных и малонильных эфиров акацетин 7-*O*-гликозида, которые могут быть перспективными соединениями для создания новых лекарственных средств.

Ключевые слова: *Agastache foeniculum*, моноаминоксидаза, ингибиторы, гликозиды акацетина, тилианин

DOI: 10.31857/S0555109924060084 EDN: QFJSVU

Нейродегенеративные заболевания представляют собой третью по распространенности группу патологий человека в мире [1]. Одной из частых причин возникновения данных нарушений нервной деятельности является повышенная активность митохондриальных моноаминоксидаз (МАО), участвующих в процессах окислительного дезаминирования биогенных аминов (серотонина, адреналина, допамина и других), что может приводить к депрессии, тревожным расстройствам, а также болезни Альцгеймера и Паркинсона [2]. Для коррекции данного типа нарушений применяются ингибиторы МАО, предотвращающие разрушение моноаминных нейротрансмиттеров и повышающие тем самым их доступность. В настоящее время для этой цели применяются различные синтетические ингибиторы МАО (коргилин, L-депренил, разагинил), которые, несмотря на свою эффективность, обладают побочными эффектами, включая гипертензию, расстройства пищеварения, бессонию, сонливость, головокружение и головные боли [3]. В ходе поисковых исследований было выявлено, что природные флавоноиды обладают

способностью ингибировать МАО изоформ А (МАО-А) и В (МАО-В), не обладая негативными эффектами синтетических лекарств [4]. Среди множества известных флавоноидов, наибольший интерес представляют флавоны, широко представленные в растениях семейства *Lamiaceae*, в частности производные акацетина, обнаруженные в *Agastache rugosa* (Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze и охарактеризованные как эффективные ингибиторы МАО-А и МАО-В [5].

В России наиболее распространенным видом рода *Agastache* является *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (син. *Lophanthus anisatus* (Nutt.) Benth.), для которого известно около 10 сортов, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений, широко применяемых с лекарственной и пищевой целью [6]. Сведения о химическом составе *A. foeniculum* ограничены данными о присутствии некоторых флавоноидов в сырье из Румынии [7]. Ранее было показано, что данный вид содержит акацетин 7-*O*-гликозид и некоторые другие флавоны [8], однако углубленных исследований

метаболитов не проводились. В этой связи представляло интерес изучить состав фенольных соединений *A. foeniculum* сорта Франт, который наиболее распространен в России в качестве высокопродуктивного медоносного растения [9].

Цель работы — изучить фенольные соединения надземной части *A. foeniculum*, культивируемого в России, выделить основные флавоноиды, определить их количественное содержание и изучить их влияние на МАО-А и МАО-В.

МЕТОДИКА

Общие экспериментальные условия. Цветки и листья *A. foeniculum* (сорт Франт; ООО “Селекционная фирма Гавриш”, Россия) были собраны в экспериментальном тепличном хозяйстве Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (Республика Бурятия, Россия) и высушены при 40°C до влажности $\leq 5\%$ в конвекционном сушильном шкафу ПРО ШСП-У 35/150-120 (ООО “Новые технологии”, Россия). Для колоночной хроматографии использовали полиамид, нормально- (SiO_2) и обращено-фазовый силикагель (ОФ- SiO_2) Сефадекс LH-20 (“Sigma-Aldrich”, США). Спектры поглощения в ультрафиолетовой области (УФ) регистрировали для растворов в метаноле на спектрофотометре СФ-2000 (“ОКБ Спектр”, Россия), масс-спектры — на ТQ-масс-спектрометре LCMS-8050 (“Shimadzu”, Япония) [10], спектры ЯМР — на спектрометре VXR 500S (“Varian”, США). Препаративную высокоэффективную жидкостную хроматографию (ПВЭЖХ) осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (“Shimadzu”, Япония), снабженном колонкой Shim-pak PREP-ODS (20 мм $\times$ 250 мм $\times$ 15 мкм, “Shimadzu”, Япония) и фотодиодным детектором SPD-M30A (“Shimadzu”, Япония), при скорости — 1.0 мл/мин и температуре колонки 20°C.

Экстракты из высушенных цветков и листьев *A. foeniculum* получали в аппарате Сокслета после исчерпывающей экстракции изопропанолом. Выход изопропанольных экстрактов, от массы воздушно-сухого сырья: цветки 35.2%, листья — 22.6%.

Выделение соединений из *A. foeniculum*. Изопропанольный экстракт из цветков *A. foeniculum* экстрагировали хлороформом в аппарате Сокслета. После этого остаток экстракта переносили на полиамид для колоночной хроматографии (10 кг), промывали водой, 70%-ным этанолом и 0.5%-ным раствором аммиака в 90%-ном этаноле и после удаления растворителей были получены фракции ТФЭ-1, фракция ТФЭ-2 и фракция ТФЭ-3, соответственно [11]. Для выделения индивидуальных соединений фракции ТФЭ-2 (500 г) и ТФЭ-3 (550 г) хроматографировали методом флэш-хроматографии на Сефадексе LH-20 (2 $\times$ 90 см, элюент — этанол—вода 90 : 10 $\rightarrow$ 50 : 50), ОФ- SiO_2 (2 $\times$ 40 см,

элюент вода—ацетонитрил 80 : 20 $\rightarrow$ 20 : 80) и SiO_2 (3 $\times$ 40 см, элюент этилацетат—этанол 100 : 0 $\rightarrow$ 60 : 40). Соединения с близкими временами удерживания разделяли, используя ПВЭЖХ в градиентном режиме. Элюент I — вода, элюент II — ацетонитрил; программа элюирования: 0–15 мин 10–30% I в II, 15–80 мин 30–70% I в II, 80–120 мин 70–100% I в II.

Гидролиз. Кислотный гидролиз соединений I–VI в 2 М ТФУ и последующий анализ продуктов гидролиза проводили как описано ранее [12]. Деацилирование соединений I–VI осуществляли в среде 0.3%-ного NaOH по известной методике [13].

Биологическая активность. Исследование влияния экстрактов листьев и цветков *A. foeniculum* и индивидуальных соединений на активность моноаминоксидаз (рекомбинантная моноаминоксидаза А и В человека, КФ 1.4.3.4, “Sigma-Aldrich” США) осуществляли с использованием флуориметрического метода [14]. Толлоксатон и паргилин применялись в качестве веществ сравнения (“SigmaAldrich”, США). Ингибиторная активность выражалась величиной IC_{50} (концентрация, вызывающая 50% ингибирование активности фермента) в мкг/мл, которую определяли графически после построения зависимости ингибиторной активности от концентрации.

Высокоэффективная хроматография с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС). Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (“Shimadzu”, Япония), соединенном с диодно-матричным детектором (ДМД) и 3Q-детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС), используя колонку ReproSil-Pur 120 C18-AQ (250 мм $\times$ 4,6 мм $\times$ 5 мкм; “Dr. Maisch GmbH”, Германия). Условия ВЭЖХ: подвижная фаза, элюент А — вода, элюент В — ацетонитрил. Программа градиента — 0–20 мин 2–80% В, 20–30 мин 80–100% В, 30–35 мин 100% В, 35–40 мин 100–2% В; инжестируемый объем — 1 мкл; скорость потока — 1 мл/мин, температура колонки — 30°C; диапазон сканирования спектров поглощения — 200–600 нм. Условия ИЭР/МС: режим ионизации — электрораспыление, положительная ионизация; температура интерфейса ИЭР — 300°C; температура линии десольватации — 250°C; температура нагревательного блока — 400°C; скорость газа-распылителя (N_2) — 3 л/мин; скорость газа-нагревателя (воздух) — 10 л/мин; давление газа, используемого для диссоциации, индуцируемой соударением (CID газ, Ar) — 270 кПа; скорость Ar — 0.3 мл/мин; напряжение на капилляре — 3 кВ; диапазон сканирования масс (m/z) 100–1900. Для построения градуировочных графиков серию разведений веществ сравнения (1–100 мкг/мл) хроматографировали в описанных выше условиях трижды для каждой концентрации вещества. По полученным данным строили градуировочные графики

в координатах “концентрация, мкг/мл — площадь пика” с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.2 (“Alentum Software, Inc.”, США).

Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимость различий средних определяли с помощью многогранового теста Дункана. Отличия при $p < 0.05$ считались статистически значимыми. Данные представлены в виде среднего из трех (количественный анализ) и пяти (биологическая активность) определений $\pm$ среднееквадратичное отклонение (S.D.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения биологически активных компонентов цветков *A. foeniculum* изопропанольный экстракт (2.64 кг) предварительно обезжиривали хлороформом, после чего фракционировали на полиамиде, что позволило получить фракции, в которых сконцентрированы нефенольные гидрофильные компоненты (фракция ТФЭ-1, 810 г), неацелированные фенольные соединения (фракция ТФЭ-2, 550 г) и фенольные кислоты и ацелированные флавоноиды (фракция ТФЭ-3, 570 г). Фракции, содержащие фенольные компоненты подвергали хроматографическому разделению на Сефадексе LH-20, обращено- и нормально-фазовом силикагеле, и очистке с применением ПВЭЖХ. В результате были выделены флавоноиды i–xiv — акацетин 7-*O*-глюкозид (25 г; i) и акацетин (7 г; ii), лютеолин 7-*O*-(6"-*O*-ацетил)-глюкозид (10 мг; iii), апигенин 7-*O*-(2"-*O*-ацетил)-глюкозид (25 мг; iv), диосметин 7-*O*-(6"-*O*-ацетил)-глюкозид (7.5 г; v), апигенин 7-*O*-(6"-*O*-ацетил)-глюкозид (18 г; vi), апигенин

7-*O*-(3"-*O*-ацетил)-глюкозид (30 мг; vii), апигенин 7-*O*-(4"-*O*-ацетил)-глюкозид (45 мг; viii), акацетин 7-*O*-(6"-*O*-малонил)-глюкозид (21 г; ix), акацетин 7-*O*-(2"-*O*-ацетил)-глюкозид (40 мг; x), акацетин 7-*O*-(6"-*O*-ацетил)-глюкозид (20 г; xi), акацетин 7-*O*-(2"-*O*-ацетил-6"-*O*-малонил)-глюкозид (125 г; xii), акацетин 7-*O*-(3"-*O*-ацетил-6"-*O*-малонил)-глюкозид (1 г; xiii) и лютеолин 7,4'-диметиловый эфир (520 мг; xiv) (рис. 1), а также 6 новых соединений — I (220 г), II (50 мг), III (3.5 г), IV (35 мг), V (5 г) и VI (14 г), идентифицированные по данным спектроскопии УФ, масс-спектрометрии (табл. 1) и ЯМР ^1H (табл. 2) и ^{13}C (табл. 3) [15, 16].

В масс-спектрах соединений I–VI были отмечены ионы, указывающие на присутствие одного (m/z 531 $\rightarrow$ 445; у I и II) или двух фрагментов малоновой кислоты (m/z 617 $\rightarrow$ 531, 445; у III и IV), уксусной и малоновой кислот (m/z 573 $\rightarrow$ 531, 487, 445; у V и VI), а также фрагмента гексозы (m/z 445 $\rightarrow$ 283; у I–VI) (табл. 1, рис. 2) [18]. Для определения природы агликона и углеводного остатка соединения I–VI подвергали гидролизу в среде 2 М ТФУ, после чего были идентифицированы акацетин (4'-метокси-апигенин) и D-глюкоза в соотношении 1 : 1. Форма УФ-спектров всех соединений указывала на замещение агликона по положению С-7, что характерно для производных акацетин 7-*O*-глюкозида (тилианина) (табл. 1) [17]. Это было подтверждено результатами щелочного дезацелирования соединений, приводившему к образованию тилианина. Данные спектроскопии ЯМР для всех изученных соединений были близки к таковым тилианина [19], но содержали сигналы, обусловленные влиянием фрагментов малоновой (δ_{H} 2.52–2.57; δ_{C} 42.0–42.4,

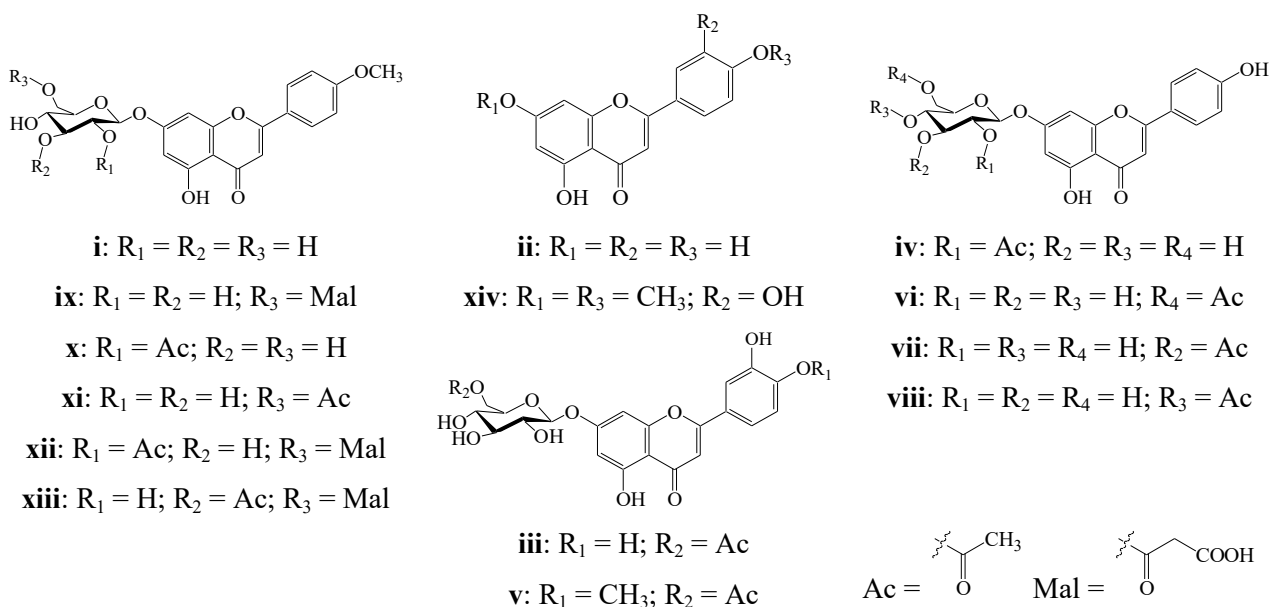


Рис. 1. Структура известных флавоноидов i–xiv, выделенных из *A. foeniculum*: Ac — ацетил, Mal — малонил.

Таблица 1. Молекулярная формула, данные УФ и масс-спектров соединений I–VI

№ соед.	Показатель	Значение
I	Формула	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃
	УФ-спектр, λ _{max} , нм	268, 332
	HR-ESI-MS, m/z	531.431 [M–H] [–] (расч. 531.446 для C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃ [M–H] [–])
	ESI-MS, m/z (%)	531 (61) [M–H] [–] , 445 (100) [(M–H)–малонил] [–] , 283 (5) [(M–H)–малонил–глюкоза] [–]
II	Формула	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃
	УФ-спектр, λ _{max} , нм	267, 332
	HR-ESI-MS, m/z	531.362 [M–H] [–] (расч. 531.446 для C ₂₅ H ₂₃ O ₁₃ [M–H] [–])
	ESI-MS, m/z (%)	531 (60) [M–H] [–] , 445 (100) [(M–H)–малонил] [–] , 283 (2) [(M–H)–малонил–глюкоза] [–]
III	Формула	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆
	УФ-спектр, λ _{max} , нм	270, 330
	HR-ESI-MS, m/z	617.301 [M–H] [–] (расч. 617.492 для C ₂₈ H ₂₅ O ₁₆ [M–H] [–])
	ESI-MS, m/z (%)	617 (72) [M–H] [–] , 531 (23) [(M–H)–малонил] [–] , 445 (100) [(M–H)–2×малонил] [–] , 283 (4) [(M–H)–2×малонил–глюкоза] [–]
IV	Формула	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄
	УФ-спектр, λ _{max} , нм	269, 333
	HR-ESI-MS, m/z	573.196 [M–H] [–] (расч. 573.483 для C ₂₇ H ₂₅ O ₁₄ [M–H] [–])
	ESI-MS, m/z (%)	573 (52) [M–H] [–] , 531 (14) [(M–H)–ацетил] [–] , 487 (9) [(M–H)–малонил] [–] , 445 (100) [(M–H)–ацетил–малонил] [–] , 283 (4) [(M–H)–ацетил–малонил–глюкоза] [–]
V	Формула	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆
	УФ-спектр, λ _{max} , нм	270, 331
	HR-ESI-MS, m/z	617.254 [M–H] [–] (расч. 617.492 для C ₂₈ H ₂₅ O ₁₆ [M–H] [–])
	ESI-MS, m/z (%)	617 (70) [M–H] [–] , 531 (20) [(M–H)–малонил] [–] , 445 (100) [(M–H)–2×малонил] [–] , 283 (5) [(M–H)–2×малонил–глюкоза] [–]
VI	Формула	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄
	УФ-спектр, λ _{max} , нм	269, 332
	HR-ESI-MS, m/z	573.207 [M–H] [–] (расч. 573.483 для C ₂₇ H ₂₅ O ₁₄ [M–H] [–])
	ESI-MS, m/z (%)	573 (50) [M–H] [–] , 531 (12) [(M–H)–ацетил] [–] , 487 (5) [(M–H)–малонил] [–] , 445 (100) [(M–H)–ацетил–малонил] [–] , 283 (2) [(M–H)–ацетил–малонил–глюкоза] [–]

167.5–168.2, 168.7–170.5) и уксусной кислот (δ_H 2.09–2.11; δ_C 20.3–20.4, 169.4–169.6) [20] (табл. 2, 3). Локализацию ацильных групп определяли по данным одно- и двумерной спектроскопии ЯМР (табл. 2, 3, рис. 3). Сравнительный анализ спектров тилианина и I выявил наличие сдвига в слабое поле сигнала C-2'' глюкозы (δ_C 72.8 → 72.5) и сильнополюсные сдвиги сигналов соседних атомов C-1'' (δ_C 100.2 → 96.8) и C-3'' (δ_C 77.3 → 73.8) [15]. В спектре НМВС выявлены корреляции между

сигналами Н-2'' (δ_H 4.89) и малонильным карбо- нилом (δ_C 168.2), что указывало на наличие заме- щения по положению C-2'' глюкозы и позволило описать строение I, как акацетин 7-О-(2''-О-ма- лонил)-β-D-глюкопиранозида. У флавона II отме- чены сдвиги в слабое поле сигнала C-4'' глюкозы (δ_C 70.2 → 72.7), а в спектре НМВС присутствовали корреляции между Н-4'' (δ_H 4.73) и малонильным карбониллом (δ_C 168.0), что возможно для акацетин 7-О-(4''-О-малонил)-β-D-глюкопиранозида. Ра- нее имелись сведения только об одном малонате

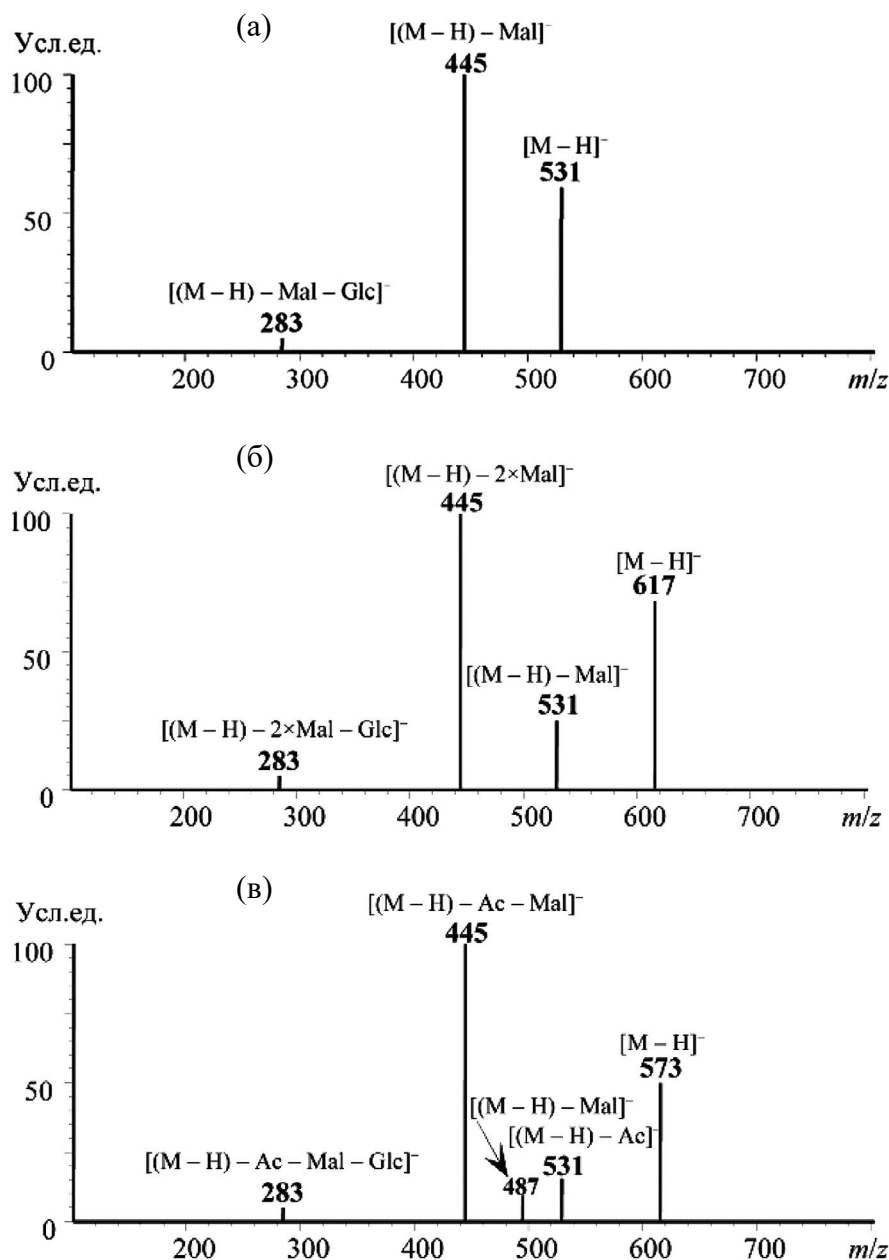


Рис. 2. Масс-спектры соединений I (а), II (б) и III (в): Ac – ацетил, Mal – малонил.

тилианина – акацетин 7-*O*-(6"-*O*-малонил)-глюкозиде, выделенном из травы *A. rugosa* полностью [15].

Дималонильные эфиры тилианина III и IV представляли собой акацетин 7-*O*-(2",6"-ди-*O*-малонил)-β-D-глюкопиранозид и акацетин 7-*O*-(4",6"-ди-*O*-малонил)-β-D-глюкопиранозид соответственно. На это указывали сдвиги в слабое поле сигналов C-2" (δ_C 72.8 → 73.4) и C-6" (δ_C 60.2 → 64.6) у III и C-4" (δ_C 70.2 → 72.9) и C-6" (δ_C 60.2 → 64.5) у IV [21], а также взаимные корреляции в спектрах НМВС. Данные о природных или синтетических дималонатах тилианина отсутствуют.

Два ацетат-малоната тилианина были идентифицированы как акацетин 7-*O*-(2"-*O*-малонил-6"-*O*-ацетил)-β-D-глюкопиранозид (V) и акацетин 7-*O*-(4"-*O*-ацетил-6"-*O*-малонил)-β-D-глюкопиранозид (VI) на основании сдвигов в слабое поле сигналов C-2" (δ_C 72.8 → 73.2) и C-6" (δ_C 60.2 → 65.3) у V и C-4" (δ_C 70.2 → 73.2) и C-6" (δ_C 60.2 → 64.3) у VI и данных спектров НМВС. Известные ацетил-малонил тилианины – акацетин 7-*O*-(2"-ацетил-6"-*O*-малонил)-глюкозид и акацетин 7-*O*-(3"-*O*-ацетил-6"-*O*-малонил)-глюкозид, были обнаружены ранее только в *A. rugosa* [15]. Новым соединениям были даны названия агастозид А (I), В (II), С (III), D (IV), Е (V) и F (VI).

Таблица 2. Сигналы спектров ЯМР ^1H (500 МГц, DMSO-d_6 , 333 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) соединений I–VI

№ соединения	δ_{H}
I	Акацетин – 6.98 (1H, с; H-3), 6.42 (1H, д, $J = 2.0$ Гц; H-6), 6.83 (1H, д, $J = 2.0$ Гц; H-8), 8.11 (2H, д, $J = 9.0$ Гц; H-2', H-6'), 7.10 (2H, д, $J = 9.0$ Гц; H-3', H-5'), 3.82 (3H, с; 4'-CH ₃ O); 7- <i>O</i> -β-D-глюкопираноза – 5.43 (1H, д, $J = 7.6$ Гц; H-1''), 4.89 (1H, м; H-2''), 3.58 (1H, м; H-3''), 3.47 (1H, м; H-4''), 3.53 (1H, м; H-5''), 3.73 (1H, дд, $J = 11.8, 5.2$ Гц; H-6'' _A), 3.90 (1H, д, $J = 11.8$ Гц; H-6'' _B); 2''- <i>O</i> -малонил – 2.52 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH)
II	Акацетин – 6.99 (1H, с; H-3), 6.10 (1H, д, $J = 1.8$ Гц; H-6), 6.80 (1H, д, $J = 1.8$ Гц; H-8), 8.09 (2H, д, $J = 8.9$ Гц; H-2', H-6'), 7.11 (2H, д, $J = 8.9$ Гц; H-3', H-5'), 3.85 (3H, с; 4'-CH ₃ O); 7- <i>O</i> -β-D-глюкопираноза – 5.25 (1H, д, $J = 7.8$ Гц; H-1''), 3.72 (1H, м; H-2''), 3.62 (1H, м; H-3''), 4.73 (1H, м; H-4''), 3.58 (1H, м; H-5''), 3.75 (1H, дд, $J = 12.0, 5.0$ Гц; H-6'' _A), 3.94 (1H, д, $J = 12.0$ Гц; H-6'' _B); 4''- <i>O</i> -малонил – 2.54 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH)
III	Акацетин – 6.96 (1H, с; H-3), 6.40 (1H, д, $J = 2.0$ Гц; H-6), 6.82 (1H, д, $J = 2.0$ Гц; H-8), 8.09 (2H, д, $J = 9.0$ Гц; H-2', H-6'), 7.08 (2H, д, $J = 9.0$ Гц; H-3', H-5'), 3.81 (3H, с; 4'-CH ₃ O); 7- <i>O</i> -β-D-глюкопираноза – 5.45 (1H, д, $J = 7.6$ Гц; H-1''), 4.92 (1H, м; H-2''), 3.57 (1H, м; H-3''), 3.50 (1H, м; H-4''), 3.72 (1H, м; H-5''), 4.35 (1H, дд, $J = 11.9, 5.8$ Гц; H-6'' _A), 4.62 (1H, д, $J = 11.9$ Гц; H-6'' _B); 2''- <i>O</i> -малонил – 2.52 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH); 6''- <i>O</i> -малонил – 2.57 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH)
IV	Акацетин – 6.95 (1H, с; H-3), 6.42 (1H, д, $J = 1.9$ Гц; H-6), 6.84 (1H, д, $J = 1.9$ Гц; H-8), 8.10 (2H, д, $J = 9.1$ Гц; H-2', H-6'), 7.12 (2H, д, $J = 9.1$ Гц; H-3', H-5'), 3.83 (3H, с; 4'-CH ₃ O); 7- <i>O</i> -β-D-глюкопираноза – 5.47 (1H, д, $J = 7.6$ Гц; H-1''), 4.93 (1H, м; H-2''), 3.55 (1H, м; H-3''), 3.50 (1H, м; H-4''), 3.73 (1H, м; H-5''), 4.30 (1H, дд, $J = 12.0, 5.6$ Гц; H-6'' _A), 4.58 (1H, д, $J = 12.0$ Гц; H-6'' _B); 2''- <i>O</i> -малонил – 2.52 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH); 6''- <i>O</i> -ацетил – 2.11 (3H, с; OC-CH ₃)
V	Акацетин – 6.95 (1H, с; H-3), 6.42 (1H, д, $J = 2.1$ Гц; H-6), 6.79 (1H, д, $J = 2.1$ Гц; H-8), 8.12 (2H, д, $J = 8.8$ Гц; H-2', H-6'), 7.10 (2H, д, $J = 8.8$ Гц; H-3', H-5'), 3.83 (3H, с; 4'-CH ₃ O); 7- <i>O</i> -β-D-глюкопираноза – 5.25 (1H, д, $J = 7.5$ Гц; H-1''), 3.70 (1H, м; H-2''), 3.65 (1H, м; H-3''), 4.82 (1H, м; H-4''), 3.76 (1H, м; H-5''), 4.38 (1H, дд, $J = 11.8, 5.7$ Гц; H-6'' _A), 4.65 (1H, д, $J = 11.8$ Гц; H-6'' _B); 4''- <i>O</i> -малонил – 2.54 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH); 6''- <i>O</i> -малонил – 2.57 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH)
VI	Акацетин – 6.93 (1H, с; H-3), 6.40 (1H, д, $J = 1.9$ Гц; H-6), 6.82 (1H, д, $J = 1.9$ Гц; H-8), 8.14 (2H, д, $J = 9.1$ Гц; H-2', H-6'), 7.09 (2H, д, $J = 9.1$ Гц; H-3', H-5'), 3.81 (3H, с; 4'-CH ₃ O); 7- <i>O</i> -β-D-глюкопираноза – 5.23 (1H, д, $J = 7.8$ Гц; H-1''), 3.69 (1H, м; H-2''), 3.62 (1H, м; H-3''), 4.78 (1H, м; H-4''), 3.79 (1H, м; H-5''), 4.40 (1H, дд, $J = 12.0, 5.7$ Гц; H-6'' _A), 4.69 (1H, д, $J = 12.0$ Гц; H-6'' _B); 4''- <i>O</i> -ацетил – 2.09 (3H, с; OC-CH ₃); 6''- <i>O</i> -малонил – 2.57 (2H, с; OC-CH ₂ -COOH)

Дополнительные сведения о компонентах *A. foeniculum* были получены в ходе ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС профилирования экстрактов из цветков и листьев данного растения (рис. 4). В результате было установлено присутствие 40 соединений, в том числе 35 – в цветках и 34 – в листьях (табл. 4). Кроме выделенных флавоноидов в цветках *A. foeniculum* после сравнения спектральных данных с таковыми известных веществ было установлено присутствие 8 производных кофейной кислоты, включая 3-*O*- (5), 4-*O*- (1), 5-*O*- (4), 3,4-ди-*O*- (14), 3,5-ди-*O*- (17), 4,5-ди-*O*-кофеиллинные кислоты (20), розмариновую кислоту (12) и литоспермовую кислоту В (18), а также апигенин 7-*O*-глюкозида (7) и нарингенин 7-*O*-глюкозида (9).

Природа пяти соединений (26, 31, 32, 36, 39) была установлена предварительно на основании УФ- и масс-спектральных данных в виде ацилированных гликозидов тилианина. Соединение 26 давало депротонированный ион с m/z 531,

последовательно распадавшийся до ионов с m/z 445 и 283, что характерно для моно-малонатов тилианина [15]. Из четырех возможных эфиров тилианина с замещением по положениям C-2'', C-3'', C-4'' и C-6'', присутствие трех уже установлено в *A. foeniculum* (2''-*O*-малонил 23, 4''-*O*-малонил 27, 6''-*O*-малонил 24), что указывало на наиболее вероятное строение 26 в виде пока не охарактеризованного 3''-*O*-малонильного эфира тилианина.

Четыре изомерных флавона 31, 32, 36 и 39 были идентифицированы как тилианин ди-*O*-малонаты, так как масс-спектры содержали набор ионов с m/z 617, 531, 445 и 283, сходный с таковым у соединений 28 и 33. Из шести возможных соединений, замещенных по C-2'', 3'', C-2'', 4'', C-2'', 6'', C-3'', 4'', C-3'', 6'' и C-4'', 6'', известны лишь акацетин 7-*O*-(2'', 6''-ди-*O*-малонил)-глюкозид (28) и акацетин 7-*O*-(4'', 6''-ди-*O*-малонил)-глюкозид (33), описанные в данной работе, что указывает на существование еще четырех новых изомерных флавоноидов.

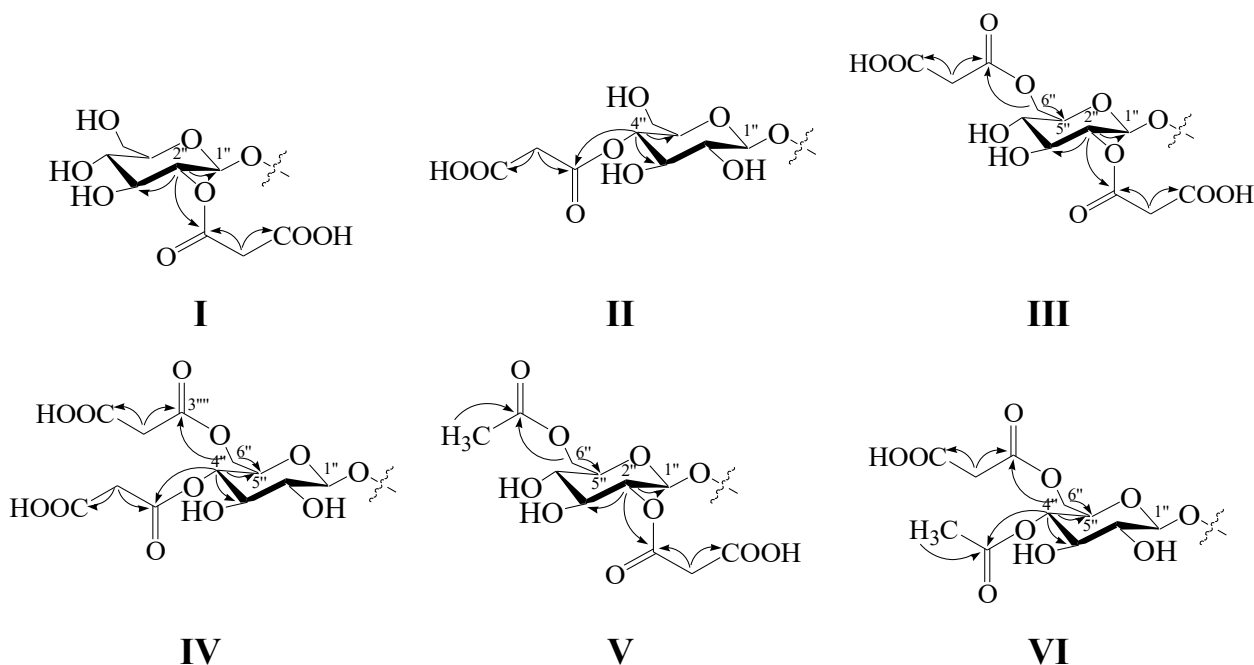


Рис. 3. Строение углеводных фрагментов новых гликозидов акацетина I–VI. Стрелками указаны ключевые корреляции в спектрах НМВС.

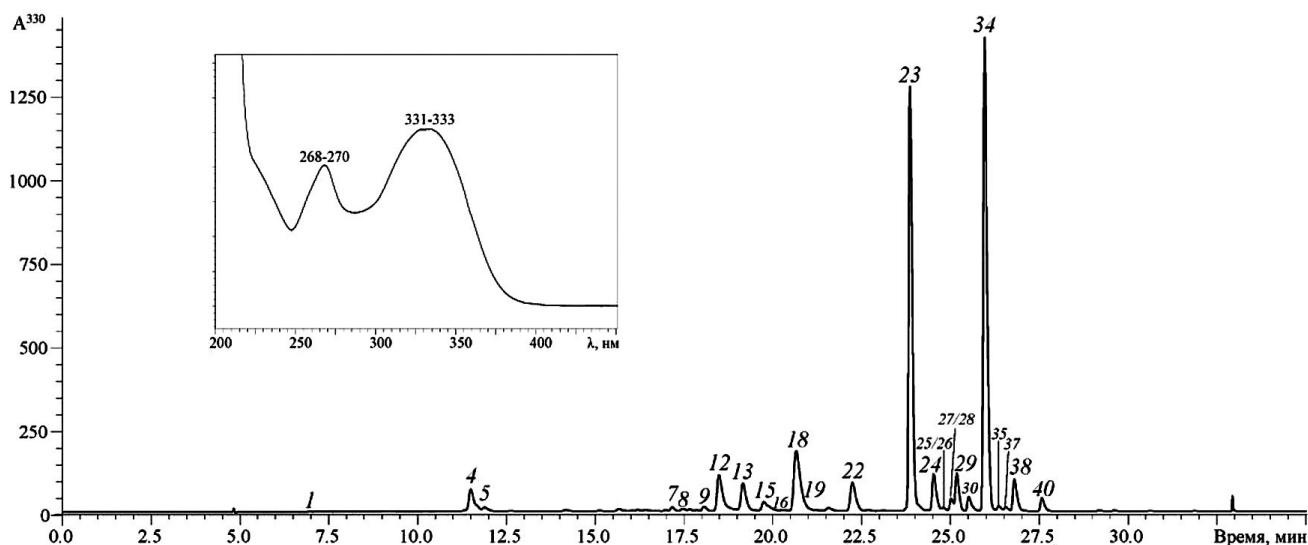


Рис. 4. Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД, $\lambda = 330$ нм) экстракта цветков *A. foeniculum* и спектр поглощения гликозидов акацетина (на врезке). Номера соединений указаны как в табл. 4.

Хроматографический профиль листьев *A. foeniculum* был близок к таковому цветков, но отличался присутствием 2-*O*- (2) и 3-*O*-кофеилтреоновых кислот (3), лютеолин 7-*O*-глюкозида (6) и двух его моноацетатов 10 и 11, а также отсутствием минорных флавонов 7, 9, 31, 32, 36 и 39. Ранее в экстрактах травы *A. foeniculum*, культивируемой в Румынии, были обнаружены 5-*O*-кофеилхинная кислота (4), лютеолин 7-*O*-глюкозид (6), апигенин 7-*O*-глюкозид (7) и розмариновая кислота (12) [21], следовательно 36 соединений (1–3, 5, 8–11, 13–40)

обнаружены впервые у этого вида. Флавоноиды 15, 22, 24, 25, 29, 34 и 35 были описаны как компоненты *A. rugosa* и *A. mexicana* первый раз полностью, т.к. другой вид [7] в отличие от 29 оставшихся фенольных соединений (1–3, 5, 8–11, 13, 14, 16–22, 23, 26–28, 30–33, 36–40), впервые выявленных у представителей рода *Agastache*.

Данные количественного анализа свидетельствовали о том, что содержание флавоноидов в цветках *A. foeniculum* (102.18 мг/г) в 4.7 раза выше такового в листьях (21.58 мг/г) (табл. 4). На долю

Таблица 3. Сигналы спектров ЯМР ¹³С (125 МГц, ДМСО-d₆, 330 К, δ_С, м.д.) соединений I–VI и акацетин 7-*O*-глюкозида (AG)

С-атом	I	II	III	IV	V	VI	AG
Акацетин							
2	163.3	163.4	163.2	163.1	163.5	163.4	163.2
3	103.0	103.2	103.2	103.0	103.1	103.3	103.1
4	181.9	182.0	181.8	181.8	182.1	181.8	181.8
5	158.5	158.2	158.6	158.2	158.1	158.2	158.3
6	99.4	99.1	99.2	99.2	99.4	99.2	99.3
7	161.9	162.0	162.1	162.0	162.2	162.1	162.0
8	95.4	95.2	95.6	95.3	95.3	95.4	95.2
9	156.8	156.4	156.7	156.7	156.2	156.4	156.7
10	105.4	105.1	105.2	105.4	105.4	105.3	105.2
1'	122.4	122.5	122.0	122.2	122.4	122.0	122.5
2', 6'	128.4	128.4	128.2	128.5	128.4	128.1	128.3
3', 5'	114.4	114.2	114.4	114.6	114.5	114.4	114.0
4'	162.6	162.4	162.7	162.7	162.8	162.9	162.5
4'-CH ₃ O	55.2	55.2	55.4	55.5	55.4	55.3	55.4
7- <i>O</i> -β-D-Глюкопираноза							
1''	96.8	100.1	96.5	100.2	96.4	100.1	100.2
2''	73.5	72.7	73.4	72.5	73.2	72.4	72.8
3''	73.8	76.2	73.9	76.0	73.8	75.8	77.3
4''	70.3	72.7	70.7	72.9	70.9	73.2	70.2
5''	76.2	75.1	75.3	74.8	75.0	74.7	76.4
6''	60.3	60.3	64.6	64.5	65.3	64.3	60.2
Малонил							
COO	168.2	168.0	167.5, 168.1	168.0, 168.2	168.3	167.5	
CH ₂	42.0	42.2	42.0, 42.3	42.0, 42.3	42.1	42.4	
COOH	170.6	170.3	168.7, 170.5	170.2, 170.5	170.5	168.7	
Ацетил							
CH ₃					20.4	20.3	
COO					169.4	169.6	

производных акацетина приходилось 94% от идентифицированных флавоноидов цветков (96.32 мг/г) и 82% от флавоноидов листьев (21.58 мг/г). Основными флавонами цветков были агастозид А (39.26 мг/г) и акацетин 7-*O*-(2''-*O*-ацетил-6''-*O*-малонил)-глюкозид (38.20 мг/г), а в листьях — агастозид А (10.49 мг/г). Концентрация производных кофейной кислоты составила 57.62 и 33.43 мг/г соответственно в цветках и листьях, в то время как общее содержание идентифицированных фенольных соединений было 159.80 мг/г в цветках и 55.01 мг/г в листьях, что значительно выше такового для Европейских сортов *A. foeniculum* (2.2–2.8 мг/г) [22].

Анализ биологической активности препаратов из *A. foeniculum* выявил, что экстракт цветков оказывал выраженное ингибиторное действие на

МАО-А и МАО-В в дозе 50 мкг/мл (63.7% и 75.4% соответственно), в то время как экстракт листьев демонстрировал меньшую эффективность ингибирования ферментов (10.3% и 15.8%).

Исследование влияния различных флавоноидов *A. foeniculum* на активность МАО-А и МАО-В показало, что неацилированные 7-*O*-глюкозиды флавоноидов демонстрировали либо слабую выраженность действия на ферменты (лютеолин 7-*O*-глюкозид) либо были неэффективны (гликозиды акацетина, апигенина, нарингенина и диосметина) (табл. 5). Наличие ацетильной группы в составе углеводного фрагмента молекулы по положениям С-4'' и С-6'' приводило к значительному возрастанию способности соединений ингибировать ферменты (МАО-А/МАО-В: гликозиды акацетина 3.89/3.44 мкМ,

Таблица 4. Хроматографическая подвижность (t_R), молекулярная формула, данные масс-спектров (ИЭР-МС) соединений 1–40 из *A. foeniculum* и их содержание в растительном сырье

№	t_R , мин	Соединение	Формула	УИ ^а	ИЭР-МС, m/z		Содержание $\pm$ S.D., мг/г ^б	
					[M+H] ⁺	дополнительные ионы	в цветках	в листьях
1	9.29	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1a	353		+	+
2	10.21	2- <i>O</i> -Кофеилтреоновая кислота	C ₁₃ H ₁₄ O ₈	1a	297		–	+
3	11.08	3- <i>O</i> -Кофеилтреоновая кислота	C ₁₃ H ₁₄ O ₈	1a	297		–	+
4	11.55	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1a	353		9.37 $\pm$ 0.18	2.86 $\pm$ 0.05
5	11.92	3- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1a	353		1.93 $\pm$ 0.03	2.03 $\pm$ 0.04
6	16.09	Лютеолин 7- <i>O</i> -глюкозид (циннарозид)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1a	447	285	–	+
7	17.20	Апигенин 7- <i>O</i> -глюкозид (космосин)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1a	431	269	+	–
8	17.48	Лютеолин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	1б	489	447, 285	+	1.58 $\pm$ 0.03
9	18.15	Нарингенин 7- <i>O</i> -глюкозид (прунин)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	1a	433	271	+	–
10	18.20	Лютеолин 7- <i>O</i> -(X"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид ^в	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	2	489	447, 285	–	+
11	18.43	Лютеолин 7- <i>O</i> -(X"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид ^в	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	2	489	447, 285	–	+
12	18.54	Розмариновая кислота	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	1a	359		15.69 $\pm$ 0.31	26.73 $\pm$ 0.54
13	19.21	Апигенин 7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	1б	473	431, 269	+	+
14	19.65	3,4-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1a	515	355	+	+
15	19.81	Диосметин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂	1б	547	461, 299, 285	1.85 $\pm$ 0.03	1.88 $\pm$ 0.03
16	20.04	Апигенин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	1б	473	431, 269	3.75 $\pm$ 0.07	0.27 $\pm$ 0.00
17	20.13	3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1a	515	355	+	+
18	20.70	Литоспермовая кислота В	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	1a	717	519	30.63 $\pm$ 0.62	1.81 $\pm$ 0.03
19	20.76	Апигенин 7- <i>O</i> -(3"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	1б	473	431, 269	+	+
20	20.81	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	1a	515	355	+	+
21	21.98	Апигенин 7- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	1б	473	431, 269	+	+
22	22.37	Акацетин 7- <i>O</i> -глюкозид (тилианин)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	1б	445	283	4.12 $\pm$ 0.08	0.68 $\pm$ 0.01
23	23.94	Акацетин 7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -малонил)-глюкозид (агастозид А)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	1б	531	445, 283	39.26 $\pm$ 0.79	10.49 $\pm$ 0.21
24	24.59	Акацетин 7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -малонил)-глюкозид	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	1б	531	445, 283	3.76 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.00
25	24.75	Акацетин 7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид (изоагастахозид)	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	1б	487	445, 283	+	+
26	24.87	Акацетин 7- <i>O</i> -(X"- <i>O</i> -малонил)-глюкозид	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	2	531	445, 283	+	0.95 $\pm$ 0.02
27	25.00	Акацетин 7- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -малонил)-глюкозид (агастозид В)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	1б	531	445, 283	+	0.23 $\pm$ 0.00

Таблица 4. Окончание

№	t _R , мин	Соединение	Формула	УИ ^а	ИЭР-МС, m/z		Содержание ± S.D., мг/г ^б	
					[M+H] ⁺	дополнительные ионы	в цветках	в листьях
28	25.08	Акацетин 7- <i>O</i> -(2'',6''-ди- <i>O</i> -малонил)-глюкозид (агастозид С)	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆	16	617	531, 445, 283	1.05 ± 0.02	0.87 ± 0.02
30	25.55	Акацетин 7- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -малонил-6''- <i>O</i> -ацетил)-глюкозид (агастозид E)	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄	16	573	531, 487, 445, 283	1.45 ± 0.03	0.10 ± 0.00
31	25.59	Акацетин 7- <i>O</i> -(X'',Y''-ди- <i>O</i> -малонил)-глюкозид ^в	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆	2	617	531, 445, 283	+	+
32	25.70	Акацетин 7- <i>O</i> -(X'',Y''-ди- <i>O</i> -малонил)-глюкозид ^в	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆	2	617	531, 445, 283	+	—
33	26.03	Акацетин 7- <i>O</i> -(4'',6''-ди- <i>O</i> -малонил)-глюкозид (агастозид D)	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆	16	617	531, 445, 283	+	—
34	26.10	Акацетин 7- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -ацетил-6''- <i>O</i> -малонил)-глюкозид	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄	16	573	531, 487, 445, 283	38.20 ± 0.79	3.75 ± 0.07
35	26.40	Акацетин 7- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> -ацетил-6''- <i>O</i> -малонил)-глюкозид	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄	16	573	531, 487, 445, 283	0.34 ± 0.00	0.36 ± 0.00
36	26.44	Акацетин 7- <i>O</i> -(X'',Y''-ди- <i>O</i> -малонил)-глюкозид ^в	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆	2	617	531, 445, 283	+	—
37	26.62	Лютеолин 7,4'-диметиловый эфир	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	16	313	299, 285	0.26 ± 0.00	+
38	26.85	Акацетин 7- <i>O</i> -(4''- <i>O</i> -ацетил-6''- <i>O</i> -малонил)-глюкозид (агастозид F)	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₄	16	573	531, 487, 445, 283	3.32 ± 0.07	0.34 ± 0.00
39	26.91	Акацетин 7- <i>O</i> -(X'',Y''-ди- <i>O</i> -малонил)-глюкозид ^в	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₆	2	617	531, 445, 283	+	—
40	27.65	Акацетин	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	16	283	269	1.29 ± 0.02	+
Суммарное содержание:								
- производных кофейной кислоты								33.43
- производных лютеолина								1.58
- производных апигенина								0.27
- производных диосметина								1.88
- производных акацетина								17.85
- флавоноидов								21.58
- фенольных соединений								55.01

Таблица 5. Показатель 50%-ого ингибирования MAO-A и MAO-B флавоноидами (гликозидами акацетина, апигенина, лютеолина) из *A. foeniculum*, IC₅₀ ± S.D., мкМ*

Углеводный фрагмент	Агликон					
	акацетин		апигенин		лютеолин	
	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B	MAO-A	MAO-B
7- <i>O</i> -Glc	> 50	> 50	> 50	> 50	12.8 ± 0.9 [†]	10.7 ± 0.8 ^{††}
7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -Ac)-Glc	> 50	> 50	> 50	> 50	—	—
7- <i>O</i> -(3"- <i>O</i> -Ac)-Glc	—	—	> 50	> 50	—	—
7- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -Ac)-Glc	—	—	3.87 ± 0.24 [†]	3.53 ± 0.23 ^{††}	—	—
7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -Ac)-Glc	3.89 ± 0.29 [†]	3.44 ± 0.25 ^{††}	3.52 ± 0.21 [†]	3.31 ± 0.22 ^{††}	2.83 ± 0.22 [†]	2.97 ± 0.21 ^{††}
7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -Mal)-Glc	> 50	> 50	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -Mal)-Glc	1.53 ± 0.11 [†]	1.48 ± 0.10 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -Mal)-Glc	2.30 ± 0.17 [†]	1.75 ± 0.12 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -Ac-6"- <i>O</i> -Mal)-Glc	2.35 ± 0.18 [†]	1.96 ± 0.15 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(3"- <i>O</i> -Ac-6"- <i>O</i> -Mal)-Glc	2.37 ± 0.18 [†]	1.90 ± 0.15 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -Ac-6"- <i>O</i> -Mal)-Glc	1.95 ± 0.14	1.63 ± 0.11 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> -Mal-6"- <i>O</i> -Ac)-Glc	3.95 ± 0.31 [†]	3.59 ± 0.27 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(2",6"- <i>O</i> -Mal ₂)-Glc	2.79 ± 0.19	2.56 ± 0.21 ^{††}	—	—	—	—
7- <i>O</i> -(4",6"- <i>O</i> -Mal ₂)-Glc	1.58 ± 0.09 [†]	1.30 ± 0.09 ^{††}	—	—	—	—

* Вещества сравнения: толоксатон — IC₅₀ MAO-A 1.78 ± 0.08 мкМ; паргиллин — IC₅₀ MAO-B 0.15 ± 0.01 мкМ. Отличия достоверны в сравнении с показателями веществ сравнения († — толоксатон, †† — паргиллин).

гликозиды апигенина 3.52–3.87/3.31–3.53 мкМ, гликозиды лютеолина 2.83/2.97 мкМ). Присутствие заместителя у С-2" и С-3" глюкозы не влияло на активность соединения. Сходный паттерн в проявлении активности был отмечен при введении с молекулу флавонов фрагмента малоновой кислоты, причем 4"-*O*-малонаты были более эффективными ингибиторами, чем 6"-*O*-малонаты. Агастозид В (акацетин 7-*O*-(4"-*O*-малонил)-глюкозид; 1.53 мкМ) оказывал большее ингибиторное влияние на активность MAO-A, чем вещество сравнения толоксатон (1.78 мкМ). Диацилированные гликозиды также ингибировали MAO-A и MAO-B, причем 2",6"- и 3",6"-дизамещенные гликозиды были менее эффективными, чем соединения с 4",6"-типом замещения. Так активность агастозидов F (акацетин 7-*O*-(4"-*O*-ацетил-6"-*O*-малонил)-глюкозид) и D (акацетин 7-*O*-(4",6"-ди-*O*-малонил)-глюкозид) в отношении MAO-A/MAO-B составила 1.95/1.63 и 1.58/1.30 мкМ соответственно. Ранее было показано, что присутствие малонильной группы у *O*-гликозилфлавонов по положению С-6" может приводить к образованию водородных связей между ацильным фрагментом и участками молекулы ферментов (Cys172 и Ile477 у MAO-B) [5]. В настоящей работе впервые показано, что 4"-*O*-малонаты флавоноидов являются более активными ингибиторами MAO-A и MAO-B, чем их 6"-*O*-замещенные аналоги.

Учитывая высокое содержание ацилированных производных тилианина у *A. foeniculum* можно

высказать предположение, что присутствие именно этой группы соединений в экстрактах растения объясняет их способность ингибировать MAO. Дополнительно было изучено влияние некоторых нефлавоноидных соединений, обнаруженных в высоких концентрациях в *A. foeniculum*, на активность MAO-A и MAO-B и установлено, что розмариновая кислота, литоспермовая кислота В и 5-*O*-кофеилхинная кислота проявляли низкую выраженность действия (IC₅₀ > 50 мкМ).

Таким образом, проведенные исследования показали, что *A. foeniculum* является источником различных фенольных соединений, включая производные кофейной кислоты и флавоноиды. Среди последних особое внимание заслуживают ацилированные гликозиды акацетина, которые обладают способностью ингибировать активность MAO-A и MAO-B и могут рассматриваться как перспективные кандидаты для создания новых лекарственных средств.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научного проекта FWSM-2021-0005 (№121030100227-7).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Lamprey R.N.L., Chaulagain B., Trivedi R., Gothwal A., Layek B., Singh J.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 1851. <https://doi.org/10.3390/ijms23031851>
2. *Youdim M.B.H., Edmondson D., Tipton K.F.* // Nature Rev. Neurosci. 2006. V. 7. P. 295–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1883>
3. *Dhiman P., Malik N., Sobarzo-Sánchez E., Uriarte E., Khatkar A.* // Molecules. 2019. V. 24. № 418. <https://doi.org/10.3390/molecules24030418>
4. *Chaurasiya N.D., Midiwo J., Pandey P., Bwire R.N., Doerksen R.J., Muhammad I., Tekwani B.L.* // Molecules. 2020. V. 25. № 5358. <https://doi.org/10.3390/molecules25225358>
5. *Lee H.W., Ryu H.W., Baek S.C., Kang M.-G., Park D., Han H.-Y., Kim H.* // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 104. P. 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.076>
6. *Абрамчук А.В., Карпунин М.Ю.* // Аграрный вестник Урала. 2017. № 2. С. 6–9.
7. *Nechita M.-A., Toiu A., Benedec D., Hanganu D., Ielciu I., Oniga O., Nechita V.-I., Oniga I.* // Plants. 2023. V. 12. № 2937. <https://doi.org/10.3390/plants12162937>
8. *Vogelmann J.E.* // Biochem. Syst. Ecol. 1984. V. 12. P. 363–366. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(84\)90067-X](https://doi.org/10.1016/0305-1978(84)90067-X)
9. *Чумакова В.В., Попова О.И., Чумакова В.В.* // Ресурсы. 2011. Т. 47. С. 51–55.
10. *Olennikov D.N., Kashchenko N.I.* // Agronomy. 2023. V. 13. № 2410. <https://doi.org/10.3390/agronomy13092410>
11. *Olennikov D.N.* // Separations. 2023. V. 10. № 255. <https://doi.org/10.3390/separations10040255>
12. *Olennikov D.N., Kashchenko N.I.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. P. 530–538. <https://doi.org/10.1134/S0003683823040099>
13. *Olennikov D.N., Chirikova N.K.* // Chem. Nat. Compd. 2019. V. 55. P. 1032–1038. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02887-1>
14. *Olennikov D.N.* // Chem. Nat. Compd. 2022. V. 58. P. 816–821. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03805-8>
15. *Seo Y.H., Kang S.-Y., Shin J.-S., Ryu S.M., Lee A.Y., Choi G., Lee J.* // J. Nat. Prod. 2019. V. 82. P. 3379–3385. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00697>
16. *Park S., Kim N., Yoo G., Kim Y., Lee T.H., Kim S.Y., Kim S.H.* // Biochem. Syst. Ecol. 2016. V. 67. P. 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.05.019>
17. *Mizuno T., Seto H., Nakane T., Murai Y., Tatsuzawa F., Iwashina T.* // Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. B. 2023. V. 49. P. 57–64. https://doi.org/10.50826/bnmnsbot.49.2_57
18. *Kachlicki P., Piasecka A., Stobiecki M., Marczak Ł.* // Molecules. 2016. V. 21. № 1494. <https://doi.org/10.3390/molecules21111494>
19. *Itokawa H., Suto K., Takeya K.* // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. P. 1777–1779. <https://doi.org/10.1248/cpb.29.1777>
20. *Olennikov D.N., Kashchenko N.I.* // Chem. Nat. Compd. 2016. V. 52. P. 996–999. <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1845-7>
21. *Norazhar A.I., Lee S.Y., Faudzi S.M.M., Shaari K.* // Appl. Sci. 2021. V. 11. № 3526. <https://doi.org/10.3390/app11083526>
22. *Duda S.C., Marghitas L.A., Dezmirean D., Duda M., Margaoan R., Bobis O.* // Ind. Crops Prod. 2015. V. 77. P. 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.045>

New Acacetin Glycosides and Other Phenolics from *Agastache foeniculum* and Their Influence on Monoamine Oxidase A and B

D. N. Olennikov^{a,*} and N. I. Kashchenko^a

^aInstitute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, 670047 Russia

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Monoamine oxidase (MAO) inhibitors are effective therapeutic agents for the treatment of neurodegenerative diseases, and natural flavonoids found in *Agastache* species belong to them. In the present study, six new acylated flavone-*O*-glycosides were isolated from *A. foeniculum* and identified using UV, NMR spectroscopy and mass spectrometry as agastoside A (acacetin 7-*O*-(2''-*O*-malonyl)-β-D-glucopyranoside), B (acacetin 7-*O*-(4''-*O*-malonyl)-β-D-glucopyranoside), C (acacetin 7-*O*-(2'',6''-di-*O*-malonyl)-β-D-glucopyranoside), D (acacetin 7-*O*-(4'',6''-di-*O*-malonyl)-β-D-glucopyranoside), E (acacetin 7-*O*-(2''-*O*-malonyl-6''-*O*-acetyl)-β-D-glucopyranoside), and F (acacetin 7-*O*-(4''-*O*-acetyl-6''-*O*-malonyl)-β-D-glucopyranoside). Using flash chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry, an additional 34 known phenolic compounds were detected. A study of biological activity showed that *A. foeniculum* flavonoids had an inhibitory effect on MAO-A and MAO-B, with the greatest effect noted for acacetin 7-*O*-glucoside acetate and malonate esters, which may be promising compounds for the development new drugs.

Keywords: *Agastache foeniculum*, monoamine oxidase, inhibitors, acacetin glycosides, tilianin