

ISSN 0555-1099

Том 59, Номер 4

Июль - Август 2023



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 4, 2023

Белки теплового шока в онкодиагностике <i>О. И. Гулий, С. А. Староверов, Л. А. Дыкман</i>	323
Перспективные свойства <i>Bacillus thuringiensis</i> и направления их использования для защиты растений <i>Р. М. Хайруллин, А. В. Сорокань, В. Ф. Габдрахманова, И. В. Максимов</i>	337
Коррозионная активность микроорганизмов, выделенных из обрастаний конструкционных материалов в прибрежной зоне Баренцева моря <i>Д. Ю. Власов, А. Л. Брюханов, Г. Г. Няникова, М. С. Зеленская, И. М. Царовцева, А. Р. Изатулина</i>	355
Свойства внеклеточной протеиназы – активатора прекалликреина плазмы крови, образуемой микромицетом <i>Aspergillus terreus</i> 2 <i>Е. С. Звонарева, А. А. Осмоловский, Н. А. Баранова, И. Б. Котова, В. Г. Крейер</i>	369
Продукция меланина грибом <i>Inonotus obliquus</i> F-1375 при культивировании в жидкой среде и его антиретровирусные свойства <i>Т. В. Теплякова, Н. А. Маркович, Н. М. Гашикова, М. П. Гашикова</i>	376
Оптимизация метода очистки рекомбинантного фактора роста тромбоцитов человека rhPDGF-BB, полученного в метилотрофных дрожжах <i>Pichia pastoris</i> <i>А.-А. В. Мистерова, В. А. Чичерин, А. С. Герасимов</i>	383
Эффективность различных ДНК-полимераз для амплификации длинных последовательностей с геномной ДНК и кДНК культурного картофеля <i>А. Д. Антипов, Н. Е. Злобин</i>	392
Ацилированные флавоноиды из <i>Cuscutis sativus</i> ингибируют активность панкреатической липазы человека <i>Д. Н. Оленников, Н. И. Кащенко</i>	401
Получение фаговых антител на белки теплового шока, динамика накопления у мышей с ксенотрансплантированными опухолями <i>Л. А. Дыкман, С. А. Староверов, Р. Д. Вырщиков, К. К. Фурсова, Ф. А. Бровко, Д. А. Солдатов, О. И. Гулий</i>	410
Об особенностях сравнительного анализа белков методами производной УФ-спектрофотометрии <i>А. Ю. Лянгузов, Н. М. Малыгина, А. М. Иванов, Т. А. Петрова</i>	418

CONTENTS

Vol. 59, No. 4, 2023

Heat Shock Proteins in Cancer Diagnostics <i>O. I. Guliy, S. A. Staroverov, and L. A. Dykman</i>	323
The Perspective Properties and the Directions of <i>Bacillus thuringiensis</i> Use for Plant Protection <i>R. M. Khairullin, A. V. Sorokan, V. F. Gabdrakhmanova, and I. V. Maksimov</i>	327
Corrosive Activity of Microorganisms Isolated from Fouling of Structural Materials in the Coastal Zone of the Barents Sea <i>D. Yu. Vlasov, A. L. Bryukhanov, G. G. Nyanikova, M. S. Zelenskaya, I. M. Tsarovtseva, and A. R. Izatulina</i>	355
Properties of Extracellular Proteinase – Activator of Blood Plasma Prekallikrein Produced by Micromycetes <i>Aspergillus terreus</i> 2 <i>E. S. Zvonareva, A. A. Osmolovskiy, N. A. Baranova, I. B. Kotova, and V. G. Kreyer</i>	369
Melanin Production by the Medicinal Mushroom <i>Inonotus obliquus</i> F-1375 in Submerged Liquid Cultivation and its Antiretroviral Properties <i>T. V. Teplyakova, N. A. Markovich, N. M. Gashnikova, and M. P. Gashnikova</i>	376
Purification Method Optimization of Recombinant Platelet-Derived Growth Factor rhPDGF-BB Expressed in Methylophilic Yeast <i>Pichia pastoris</i> <i>A.-A. V. Misterova, V. A. Chicherin, and A. S. Gerasimov</i>	383
The Efficiency of Various DNA Polymerases for Amplification of Long Sequences from Genomic DNA and cDNA of Cultivated Potato <i>A. D. Antipov and N. E. Zlobin</i>	392
Acylated Flavonoids from <i>Cucumis sativus</i> Inhibit Activity of Human Pancreatic Lipase <i>D. N. Olennikov and N. I. Kashchenko</i>	401
Preparation of Phage Antibodies to Heat Shock Proteins and Studying the Dynamics of their Accumulation in Mice with Xenotransplant Tumors <i>L. A. Dykman, S. A. Staroverov, R. D. Vyrshchikov, K. K. Fursova, F. A. Brovko, D. A. Soldatov, and O. I. Guliy</i>	410
On Particular Regimens of Derivative UV-spectrophotometry for Comparative Analysis of Proteins <i>A. Y. Lianguzov, N. M. Malygina, A. M. Ivanov, and T. A. Petrova</i>	418

УДК 57.083:57.084

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА В ОНКОДИАГНОСТИКЕ

© 2023 г. О. И. Гулий^{1, *}, С. А. Староверов^{1, 2}, Л. А. Дыкман¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов,
ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии
и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

*e-mail: gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2023 г.

После доработки 27.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

В связи с растущим числом онкологических заболеваний требуются новые вспомогательные инструменты для получения обширных молекулярных профилей пациентов, которые помогут выявить заболевание. Ранняя диагностика онкологических заболеваний основывается на анализе соответствующих биомаркеров, с помощью которых можно проводить мониторинг населения для выявления заболевания, когда оно не может быть определено с помощью стандартных методов и не проявляется клинически. Одним из потенциальных маркеров онкологического заболевания являются белки теплового шока, выполняющие функцию молекулярных шаперонов. Изменение экспрессии белков теплового шока может служить важным диагностическим маркером реакции клетки на повреждение. В работе представлен краткий обзор о распространенности онкологических заболеваний в мире, необходимости развития ранней онкодиагностики, а также перспективах использования белков теплового шока при постановке онкологического диагноза.

Ключевые слова: белки теплового шока, диагностика рака, шапероны, сверхэкспрессия, онкомаркеры

DOI: 10.31857/S0555109923040062, **EDN:** QZBTFA

Онкологические заболевания являются одними из важнейших причин смерти населения планеты. Согласно данным ВОЗ в 2020 г. было зарегистрировано почти 10 млн смертей от различных видов рака (рак легких, толстой кишки, прямой кишки, печени, желудка и молочной железы). Уже несколько десятков лет онкологические заболевания занимают второе место в списке основных причин смерти после заболеваний сердечнососудистой системы [1]. В связи с растущим числом смертельных исходов, связанных с раком, требуются новые вспомогательные инструменты для получения обширных молекулярных профилей пациентов, которые помогут клиницисту поставить правильный диагноз и прогноз. Одним из таких вспомогательных инструментов является диагностика с помощью специфичных биомаркеров. К сожалению, в отношении связанных с раком заболеваний не существует ни одного молекулярного маркера, который мог бы предоставить достаточную информацию, чтобы помочь клиницистам сделать эффективный прогноз или даже поставить диагноз. Как правило, необходимо оценивать большие панели маркеров, которые охватывают несколько различных классов (мутации в определенных фрагментах генов; повышенная/недостаточная

экспрессия генной активности, контролируемая матричными РНК; количество белков, присутствующих в сыворотке или циркулирующих опухолевых клетках).

Одним из потенциальных маркеров онкологического заболевания являются белки теплового шока (*heat shock proteins*, HSP), которые играют важную роль в организации и транспорте пептидных молекул, в процессах апоптоза [2]. Аномальные уровни экспрессии и/или субклеточная локализация HSP были обнаружены при различных видах рака. С открытием их иммуномодулирующей противоопухолевой активности все большее внимание исследователей привлекает возможность использования шаперонов в клинической онкологии. В работе описана необходимость ранней онкодиагностики и перспективы использования HSP в качестве биомаркеров онкологического процесса.

ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ В СОВРЕМЕННОМ МИРЕ

Одной из характерных особенностей рака является быстрое размножение аномальных клеток, разрастающихся за пределы своих обычных границ и способных проникать в окружающие ткани, а

также мигрировать в другие органы – метастазировать. Рак возникает в результате перерождения нормальных клеток в опухолевые в рамках многоэтапного процесса, в ходе которого предраковое поражение обычно переходит в злокачественную опухоль [3].

Неуклонный рост численности онкологических заболеваний и связанная с ним смертность населения привлекает внимание ученых всего мира к развитию новых методов их ранней диагностики. Диагностика рака зависит от этапа развития заболевания, поэтому на каждом этапе могут применяться разные методы диагностики [3–5]. Важно, что многие виды рака излечимы при своевременной постановке диагноза и назначении лечения.

ВОЗ заявляет, что при ранней диагностике и своевременном лечении можно было бы избежать более 30% смертей от рака [6, 7]. Установлено, что более 70% случаев смерти во многих развивающихся странах, произошло из-за отсутствия ранней клинической диагностики и связанного с этим отсутствием своевременного надлежащего лечения [8]. Современные методы терапии рака позволяют излечивать или продлевать жизнь пациентам с начальными формами многих онкологических заболеваний, поэтому снижение смертности от онкологических заболеваний можно достичь путем внедрения методов ранней диагностики [9]. Более того, ранняя диагностика рака позволяет прогнозировать ответ на лечение и тяжесть заболевания у пациентов, обеспечивая индивидуальный подход к больному.

Раннее выявление рака предназначено для обнаружения злокачественных заболеваний на этапе, когда сами больные еще не замечают никаких клинических признаков [10, 11]. Одним из основных направлений по развитию и совершенствованию методов диагностики рака является применение биомаркеров. Несмотря на то, что положительный результат при определении онкомаркеров не всегда свидетельствует о наличии злокачественного образования, на основании положительного результата назначается детальное обследование. Объем мирового рынка онкодиагностики с помощью биомаркеров по данным GlobeNewswire в 2022 г. составил 11.38 млрд долларов. Предполагается, что он вырастет по данным различных источников от 30 до 50 млрд долларов США в 2030 г. При этом мировой рынок биомаркеров, используемых в различных областях медицины, может вырасти до 88 млрд долларов.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ ПРИ ОНКОДИАГНОСТИКЕ

Текущая диагностика опухолей основывается на множестве сложных клинических подходов, которые включают рентгенографию, компьютерную

томографию, магнитно-резонансную томографию, позитронно-эмиссионную томографию, эндоскопию, сонографию, термографию, цитологию и др. Кроме того, все более популярными становятся молекулярные инструменты диагностики, основанные как на геномных, так и на протеомных данных, такие как полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ, иммуногистохимия и проточная цитометрия.

Внедрение указанных методов онкодиагностики позволило повысить показатели раннего выявления рака и назначение своевременного лечения, тем самым снижая заболеваемость инвазивным раком в долгосрочной перспективе и улучшая общий прогноз течения заболевания. Данные методы онкодиагностики отличаются значительными преимуществами из-за возможности применения в клинических условиях. Тем не менее, эти методы имеют ряд ограничений, связанных с необходимостью выбора оптимальной диагностической мишени и наличием артефактов, особенно при диагностике глубоко расположенных опухолей. Кроме того, данные методы характеризуются дорогостоящей в применении [4, 12].

При этом различные визуализирующие, молекулярные и недорогие диагностические инструменты и связанные с ними технологические достижения для эффективной диагностики рака могут быть использованы для развития методов диагностики, основанных, в частности, на использовании биомаркеров [13].

В 1980 г. Национальный институт рака США определил биомаркер как биологическую молекулу, которая обнаруживается в сыворотке, жидкостях организма или тканях, что является сигналом нормального или ненормального состояния или заболевания. Биомаркеры играют важную роль для обследования, диагностики и лечения. Это помогает предоставить информацию о природе/стадии и развитии конкретного заболевания [14].

Поскольку было обнаружено, что ранняя диагностика рака улучшает прогноз из-за эффективности различных методов лечения на этой стадии, а использование молекулярных таргетных методов лечения значительно снижает побочные эффекты, прилагаются большие усилия для разработки диагностических биомаркеров и подходов, нацеленных на высокочувствительные и специфические аналитические возможности со снижением ложноотрицательных результатов [13].

Онкомаркеры – специфические вещества, продукты жизнедеятельности опухоли или вещества, продуцируемые нормальными тканями в ответ на инвазию раковых клеток, которые обнаруживаются в крови или других биологических жидкостях больных раком [15]. Выявление онкомаркеров позволяет заподозрить наличие опухоли в организме на ранней стадии, проводить масштаб-

ные скрининговые исследования и отслеживать динамику болезни в процессе лечения. Первыми открытым онкомаркером стал альфа-фетопротеин — белок беременных, синтезируемый плацентой [16]. Он отсутствует в крови взрослых людей, но вновь появляется при опухолях печени и репродуктивной системы. Альфа-фетопротеин стал первым серологическим маркером опухолей, вошедшим в широкую клиническую практику. В настоящее время проводят лабораторную диагностику более чем 30 различных онкомаркеров, основные из которых представлены на рис. 1 (<https://www.ckbran.ru/diagnostic/laboratornye-analizu-i-issledovaniya/analiz-na-onkomarkery>). Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) одобрены к использованию в клинической практике 27 биомаркеров и лабораторных тестов на их основе [17]. Наиболее часто применяются исследования маркеров злокачественных новообразований следующих органов: печени, молочной железы, легкого, поджелудочной железы, яичников, желудка, кишечника, щитовидной железы, крови [15, 17]. Исследование различных маркеров рака предстательной железы в сыворотке крови (PSA, HPC1, PCA3, TMPRSS2, ETS, GSTP1, AMACR, GOLPH2, ERCA) используют для скрининга и оценки целесообразности проведения биопсии. Тест применяют также для контроля эффективности лечения и выявления рецидивов рака простаты. Этот метод стал основным при постановке предварительного диагноза [18, 19]. Выявление биомаркеров опухоли в крови полезно для мониторинга роста опухоли и оценки влияния противоопухолевой терапии неинвазивными методами [20–22].

Чувствительное обнаружение биомолекул или химических веществ является важной стороной клинической диагностики рака, поскольку раннее обнаружение может увеличить шансы на выздоровление и выживания. Однако на самых ранних стадиях заболевания концентрация клинически важных биомолекул/химических веществ очень низкая. Поэтому разработка недорогих инструментов для диагностики рака является важным направлением развития онкологии. Так, например, метод ИФА представляет собой чувствительный и надежный инструмент для измерения свободного и везикулярного HSP70 в жидких биоптатах пациентов с опухолями, уровни которого можно использовать в качестве опухолеспецифического биомаркера для оценки риска и мониторинга терапевтических результатов, в частности, при мелкоклеточной карциноме легкого и глиобластоме [22]. Простой и недорогой анализ крови или анализ биологических жидкостей на основе биосенсорного подхода к онкодиагностике имеют эффективный потенциал для применения на начальной стадии рака [23–28].

В 2016 г. Американской ассоциацией содействия развитию науки разработан прибор EFIRM (*electric field-induced release and measurement*) для выявления признаков рака легких в слюне менее чем за 20 мин [29]. Помимо циркулирующей опухолевой ДНК в слюне больных раком полости рта повышается уровень белковых опухолевых маркеров, в частности, белков *Cyfra 21-1*, *TPS* и *CA125*. Поэтому можно искать аномальные РНК (в частности, длинные некодирующие РНК) в образцах слюны, чтобы проверить наличие рака полости рта [30]. Последние достижения в молекулярной биологии в совокупности с аналитическими платформами позволили выявить растущее число потенциальных биомаркеров в крови, моче, конденсате выдыхаемого воздуха, образцах бронхов, слюны и мокроты. На рис. 2 в качестве примера представлены основные виды маркеров, характерные для разных типов онкологических заболеваний [1].

Таким образом, биомаркеры играют важную роль при исследованиях, диагностике и лечении рака. Определение уровня биомаркеров помогает получить информацию о природе и стадии развития конкретного заболевания. Важно, что уровень онкобиомаркеров, как правило, напрямую связан с конкретной стадией опухолевого процесса, и который можно легко диагностировать. При этом важно понимать роль клинических испытаний для оценки новых биомаркеров. Параллельно необходимо разрабатывать единые стандарты тестирования, устанавливающие высокий уровень контроля воспроизводимости результатов тестов в лабораториях и снижения процента ложноположительных/ложноотрицательных результатов.

ФУНКЦИИ ШАПЕРОНОВ

Особое внимание заслуживает применение в онкодиагностике HSP, выполняющих функцию молекулярных шаперонов. HSP относятся к семейству высоко консервативных внутриклеточных белков, участвующих в укладке протеинов в ответ на стрессы или высокую температуру [31, 32].

Известно, что оптимальный рост клеток наблюдается в достаточно узком диапазоне физиологических условий (температур, pH), но клетки имеют способность к приспособлению к умеренным отклонениям от таких условий. Одной из наиболее хорошо изученных клеточных адаптаций является реакция на тепловой шок [33]. В условиях теплового шока многие клеточные белки либо защищают клетки от гибели, либо запускают апоптоз, когда нанесенный ущерб необратим. Эти белки и называются HSP [34]. Некоторые из HSP защищают белки от агрегации, разворачивают агрегированные белки и рефолдируют поврежденные белки — выполняют функции шаперонов [35].

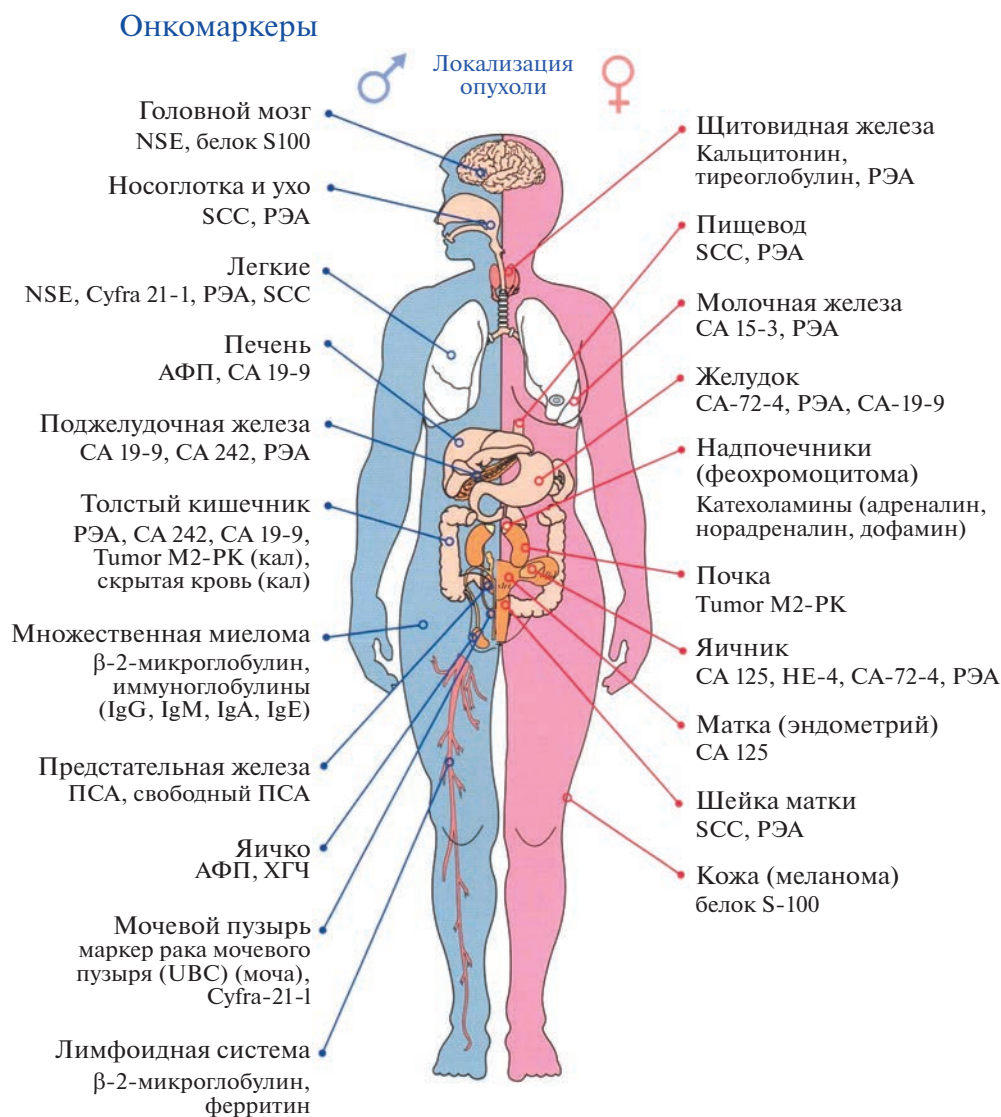


Рис. 1. Основные биомаркеры, используемые в лабораторной диагностике рака (<https://www.ckbran.ru/diagnostic/lab-oratornye-analizy-i-issledovaniya/analiz-na-onkomarkery>).

Молекулярный шаперон — это основной класс белков, присутствующих на всех уровнях клеточной организации, от бактерий до человека. Они имеют различную организацию и функции в зависимости от клеточного расположения и сложности организма. Бактериальные белки-шапероны находятся только в цитозоле, так как не являются компартментализованными, но у высших организмов они также локализованы в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и хлоропластах. Основные функции HSP представлены на рис. 3 [36].

Молекулярные шапероны обнаруживаются во всех компартаментах клетки, где происходят сворачивание или, в более общем смысле, конформационные перестройки белков. Хотя синтез белка является основным источником развернутых

полипептидных цепей, другие процессы также могут генерировать развернутые белки. При нефизиологически высоких температурах или в присутствии некоторых химических веществ белки могут становиться структурно лабильными и даже разворачиваться. В конечном итоге это приводит к потере функции пораженных белков и накоплению белковых агрегатов. Клетка реагирует на эту угрозу, вырабатывая увеличивающееся количество специфических защитных белков — явление, называемое реакцией на тепловой шок или реакцией на стресс [37].

С использованием компьютерного анализа тканевых транскриптомов обнаружено, что система шаперонов состоит из основных элементов, которые единообразно экспрессируются в тканях, и переменных элементов, которые экспрессиру-

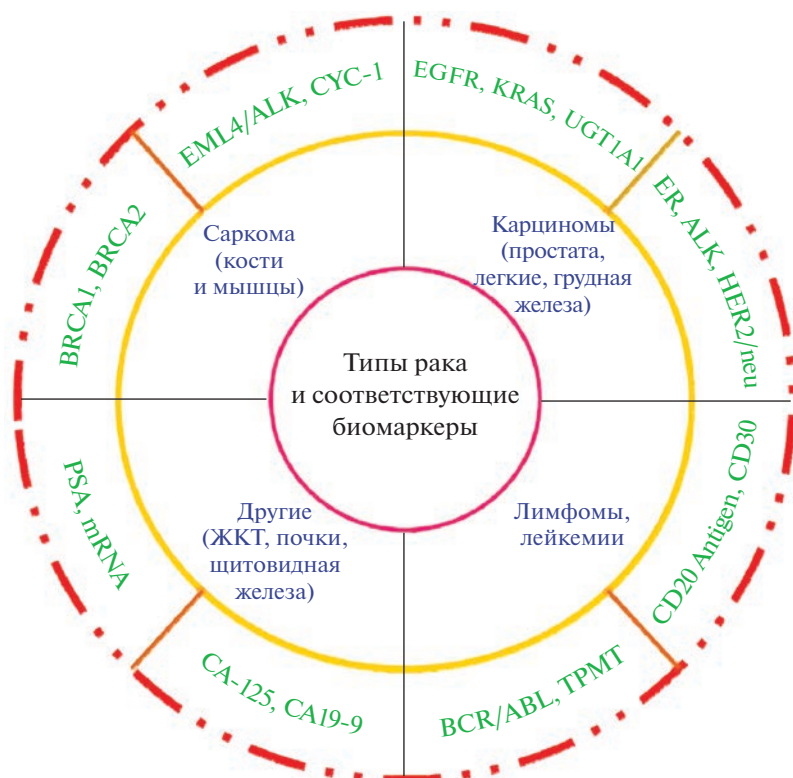


Рис. 2. Типы рака и соответствующие им биомаркеры [1 с изменениями].

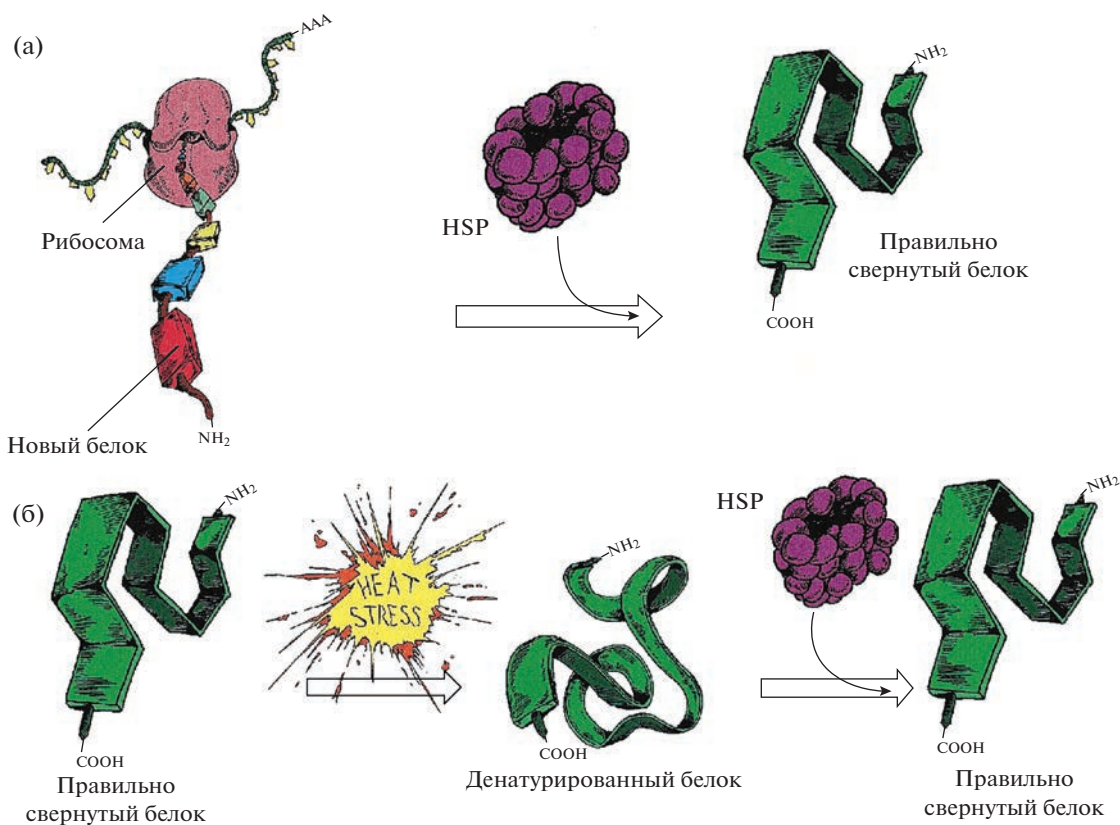


Рис. 3. Основные функции HSP. (а) HSP помогают сворачивать протеины в функциональные белки. (б) После стресса HSP также способствуют рефолдингу или деградации поврежденных или денатурированных белков [36 с изменениями].

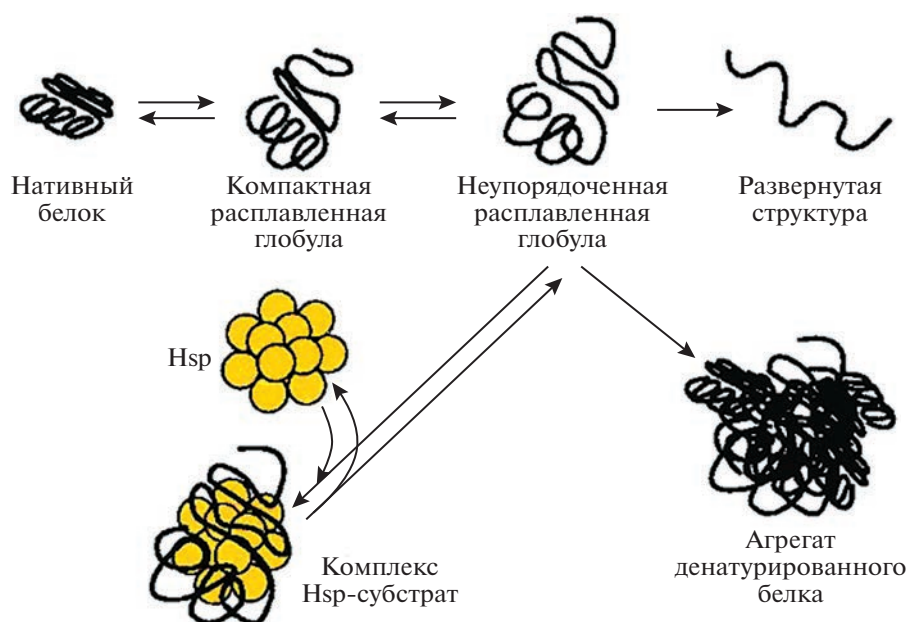


Рис. 4. Предполагаемый механизм взаимодействия HSP с частично денатурированными белками [41 с изменениями].

ются по-разному, чтобы соответствовать тканеспецифическим требованиям [38].

Термин “молекулярный шаперон” используют для описания функционально родственного набора белков. По молекулярной массе молекулярные шапероны делят на несколько классов. Клетка может экспрессировать несколько членов одного и того же класса шаперонов. Например, для HSP90 в Protein Data Bank доступна 541 запись, причем большинство записей были получены от *Homo sapiens*. А количество молекулярных структур, доступных для HSP104 (18 записей), были в основном получены из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [39, 40]. Белки из одного и того же класса молекулярных шаперонов часто обнаруживают значительную степень гомологии последовательностей и структурно и функционально родственны, тогда как между шаперонами из разных семейств почти нет гомологии. Несмотря на это разнообразие, большинство молекулярных шаперонов имеют общие функциональные особенности.

Очевидно, что основным свойством любого молекулярного шаперона является его способность связывать развернутые или частично свернутые полипептиды. На ранних стадиях фолдинга или при неправильном фолдинге гидрофобные остатки белка частично доступны для растворителя и, таким образом, делают его уязвимым для агрегации. Ассоциация этих видов гидрофобных белков с молекулярными шаперонами эффективно подавляет агрегацию (рис. 4 [41]). Низкая специфичность гидрофобного взаимодействия и конформационная гибкость интермедиатов укладки обеспечивают беспорядочное действие шаперонов:

они связываются с большим разнообразием полипептидов, сильно различающихся аминокислотной последовательностью и конформацией. Однако, поскольку большинство нативных белков и многие промежуточные продукты позднего фолдинга не имеют гидрофобных участков, они больше не являются субстратами для молекулярных шаперонов.

Структурно-функциональная организация шаперонов эволюционно сохраняется в пределах одного и того же царства, но различается между ними. На основе общей молекулярной массы основные шапероны классифицируются как: HSP40 (DNAJ), шаперонины HSP60 (GroEL/GroES, Cpn60/Cpn10, HSP60/HSP10, Tric/CCT, Thermosome), HSP70 (DnaK, DnaJ, GrpE, HSPA), HSP90 (HSPC, TRAP, HtpG), HSP100 (ClpA, ClpB, ClpP), HSP110 (HSPH), малые шапероны (sHSP) [40]. Известно несколько групп шаперонов, объединенных в семейства в зависимости от их молекулярной массы: HSPH (Hsp110), HSPC (Hsp90), HSPA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), семейство малых HSPB (sHSP), а также семейство шаперонинов HSPD/E (HSP60/HSP10) [42]. Основные классы HSP представлены в табл. 1 [43].

Другими важными белками-шаперонами, играющими роль в развитии теплового шока, являются префолдин, кальнексин/кальретикулин, GRP94, GRP170, AAA 231 ATPases/PPIases, PDIases, NAC, CasA 232 и HtpX [42, 44].

Многие члены семейства HSP выполняют свои функции в качестве молекулярных шаперонов, стабилизируя белки для обеспечения их правильного фолдинга, ингибируя вызванную стрессом

агрегацию белков или регулируя клеточную сигнализацию и транскрипционные сети [45–47]. Повышенная экспрессия HSP в стрессовых условиях часто транскрипционно регулируется фактором теплового шока 1 (*heat shock factor 1*; HSF1). В ответ на стрессовые условия HSF1 фосфорилируется и образует гомомеры, а затем связывается с элементами теплового шока и активирует транскрипцию генов теплового шока.

Помимо своей основной роли в фолдинге белков, шапероны участвуют в транспорте и деградации белков, диссоциации агрегатов и рефолдинге белков, денатурированных стрессом, и сборке и разборке макромолекулярных комплексов. Многие молекулярные шапероны входят в число HSP, избирательно экспрессирующихся в клетках, подвергающихся метаболическому стрессу [48]. Молекулярные шапероны как механизм белкового гомеостаза были задействованы в качестве первой линии защиты от таких заболеваний, как сердечно-сосудистые заболевания, алкогольный гепатит, катаракта, муковисцидоз, фенилкетонурия, что позволяет использовать их в качестве молекулярных маркеров для диагностики. Эксперименты показали, что сверхэкспрессия шаперонов у мышей эффективно подавляла нейродегенерацию [49–51]. Было установлено, что HSP27 действует как шаперон для образования мультимерных комплексов в клетках, стабилизации денатурированных или агрегированных белков и возвращения их в исходную форму [52].

Шапероны регулируют конформацию белков при незначительном повреждении [53]. Более поздние исследования показали присутствие молекулярных шаперонов в фолдинге вновь синтезированных белков, они участвуют в их транспорте через мембраны, а также встраивании в различные органеллы [54]. Шапероны ингибируют изменение конформации белков при повышении температуры в клетке до 42°C.

БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ОНКОДИАГНОСТИКИ

Долгое время HSP считались типичными внутриклеточными и органеллоспецифичными молекулами. В клетке HSP играют важную роль в организации и транспорте пептидных молекул, в процессах апоптоза [2]. Предполагается участие HSP в процессах некроза и очищения организма от некритизированных клеток [43]. Взаимодействуя с рецепторами стероидных гормонов, HSP предотвращают включение стрессорных программ клетки до наступления стресса. В условиях же его развития — смягчают избыточную сенсорную стимуляцию данными гормонами [43].

Показано [55–57], что HSP также встречаются в цитозоле, плазматической мембране, внеклеточных участках, внеклеточных везикулах, биологических жидкостях и в кровотоке. Аномальные уровни экспрессии и/или субклеточная локализация HSP были обнаружены при различных видах рака. Причем степень сверхэкспрессии варьирует в широких пределах и зависит от типа рака, его локализации и конкретного пациента. Так, например, обнаружено, что при плоскоклеточном раке легкого количество HSP70 в сыворотке оказалось выше, чем при аденокарциноме легкого, но в обоих случаях уровень HSP70 был выше, чем у здорового контроля [58].

Оценка свободного HSP70 в сыворотке и плазме с использованием ИФА может дать полезный инструмент для обнаружения опухолей и мониторинга клинического исхода лечения [58, 59]. Более того, растворимый HSP70 был полезен для обнаружения опухолей на ранних стадиях. Валидация HSP70 в качестве опухолеспецифического биомаркера была изучена для мониторинга результатов лучевой терапии на моделях опухолей у мышей и у пациентов с раком [60, 61]. Abe с соавт. [62] указали, что HSP70 является маркером рака простаты и использование HSP70 наряду с тестом на простат-специфический антиген (PSA) может быть полезно при выявлении пациентов с раком простаты на ранней стадии, который может быть пропущен с помощью только скрининга PSA [62]. Другие результаты свидетельствуют о том, что четыре члена семейства HSP70 играют важную роль в патогенезе ГЦК (гепатоцеллюлярная карцинома), связанной с вирусом гепатита С, и могут быть молекулярными мишенями для диагностики и лечения заболевания [63]. HSP27 как потенциальный биомаркер также может помочь в диагностике ГЦК [64].

Обнаружение новых антигенов, связанных с опухолью, и аутоантител у больных раком может способствовать диагностике злокачественной опухоли на ранней стадии и определить эффективность новых видов иммунотерапии. HSP участвуют не только в опухолевой прогрессии, но и также в определении их реакции на лечение. Так детекция аутоантител против HSP70 в сыворотках крови пациентов с плоскоклеточным раком пищевода обеспечила эффективный инструмент, который может найти клиническое применение при диагностике рака [65].

HSP70 часто сверхэкспрессирован опухолевыми клетками мочевого пузыря и может использоваться в качестве биохимического маркера у пациентов с раком мочевого пузыря [66]. Авторы [67] показали, что экспрессия HSP90 в злокачественных клетках примерно в два-десять раз выше, чем в нормальных клетках, что указывает на его важную роль в росте и выживании опухолевых

клеток, и его можно рассматривать как эффективную лекарственную мишень.

P-HSP27 был использован в качестве потенциального биомаркера для прогнозирования роли аутофагии, вызванной химиотерапией, в ответ остеосаркомы на терапию. Увеличение P-HSP27 связано с высокой чувствительностью к противоопухолевым препаратам, когда аутофагия была ингибирована. P-HSP27 представляет прогностический биомаркер для оценки эффективности комбинированной терапии с модуляторами аутофагии и химиотерапевтическими препаратами [68]. Также было установлено, что концентрации антител против HSP20 обратно коррелировали с прогрессированием опухоли при раке яичников [69]. Эти исследования продемонстрировали аномальную экспрессию HSP в различных опухолях человека (опухоли яичников, толстой кишки, молочной железы, легких и простаты). Повышенная экспрессия HSP показала плохой прогноз пациентов с колоректальным раком и раком желудка [70]. Раппа с соавт. [71] показали, что HSP10 и HSP60 являются многообещающими биомаркерами для ранней диагностики канальцевой аденомы как в эпителии, так и в собственной пластинке слизистой оболочки, и его дифференциации от более развитых злокачественных поражений. Таким образом, HSP10 и HSP60 могут потенциально рассматриваться как удобные мишени для терапии [71].

В литературных источниках появляется все больше доказательств того, что HSP сверхэкспрессированы во многих типах злокачественных опухолей, а повышенные уровни HSP усиливаются за счет гиперактивации HSF, что само по себе способствует инвазии и метастазированию опухоли [72, 73]. Например, в работах [74, 75] показано, что уровни HSP повышены при многих видах рака, а их сверхэкспрессия связана с плохим прогнозом и ответом на терапию при раке молочной железы и простаты. Таким образом, активированный HSF и повышенный уровень HSP являются своеобразными биомаркерами для ранней диагностики опухолей и прогноза при мониторинге лечения у пациентов с распространенными видами рака [76, 77].

В работе [78] авторы указали на важность определения уровня белков HSP27, HSP60, HSP70 и HSP90 для диагностики и прогнозирования результатов лечения рака молочной железы. Показано, что уровни HSP27, HSP60, HSP70 и HSP90 в сыворотке пациентов до лечения были значительно выше, чем в контрольной группе.

Уровни циркулирующего HSP27 были повышены при эпителиальном раке яичников, немелкоклеточном раке легкого, раке толстой кишки. HSP60 можно использовать для ранней диагностики тубулярной аденомы, аденокарциномы легких. HSP70 может служить диагностическим инстру-

ментом для рака предстательной железы, рака молочной железы. Повышенные уровни HSP90 показали хорошую корреляцию с наличием хронического миелоидного лейкоза, рака молочной железы, рака головного мозга [79].

Повышенная экспрессия HSP60 и HSP70 может использоваться в качестве признака карциномы мочевого пузыря [80, 81]. Показано, что экспрессия HSP70 постепенно увеличивается по мере прогрессирования гепатокарциногенеза [82]. HSP27 и HSP70 могут иметь диагностическое и прогностическое значение для различных гинекологических злокачественных новообразований [83]. Анализируя уровень HSP, присутствующих в моче, можно предсказать рак с точностью примерно 90% с помощью машинного обучения [84].

При диагностике необходимо учитывать возможность ложноположительных результатов. Так, например, показано, что тестирование биоптата опухоли молочной железы на наличие HSP90 может оказаться невозможным у пациентов с миастенией, поскольку соседняя ткань тимуса может дать ложноположительный диагностический тест [85].

ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БТШ

С открытием иммуномодулирующей противоопухолевой активности HSP все больше внимание исследователей привлекает возможность использования этих шаперонов в клинической онкологии. Избирательное выключение функции HSP различными фармакологическими агентами приводит к гибели раковых клеток и задержке роста опухоли [2].

В настоящее время сформировалось два основных подхода в применении HSP:

– пептидсвязывающая функция HSP и их способность доставлять определенные опухолевые антигены в антигенпрезентирующие клетки с последующим формированием специфического иммунного ответа;

– роль шаперонов (прежде всего HSP90) в поддержании внутриклеточного гомеостаза.

Описано несколько молекулярных механизмов, вовлекающих HSP в устойчивость к терапии рака. В качестве молекулярных шаперонов они могут обеспечивать защиту клеток, более эффективно восстанавливая поврежденные белки в результате введения цитотоксических препаратов, защищая раковые клетки от апоптоза, защищая микроциркуляторное русло внутри опухолей и усиливая репарацию ДНК [78, 86, 87].

HSP также могут играть важную роль в формировании противоопухолевого адаптивного иммунного ответа [88]. Их шаперонная активность, по сути, лежит в основе медиации эффективного захвата, процессинга и кросс-презентации опухо-

Таблица 1. Белки теплового шока в эукариотических клетках [43]

Ориентировочная молекулярная масса, кДа	Эукариотические белки	Функция
10	Hsp10	Участвуют в формировании перекрестной резистентности, в восстановлении нативной конформации белковых молекул и активности ферментов, в синтезе гликопротеинов. Являются одним из обязательных звеньев неспецифического ответа на повреждение
20–30	Группа HspB включает 10 представителей, в том числе Hsp27	Шапероны, играют роль в реализации апоптоза и реорганизации микрофиламентов, участвуют в сокращении гладкой мускулатуры
40	Hsp40	Кофактор Hsp70
60	Hsp60	Участвуют в фолдинге белков после их посттрансляционного транспорта в митохондрию
70	Группа HspA. Включает Hsp71, Hsp70, Hsp72, Grp78 (BiP)	Принимает участие в сворачивании и разворачивании белков, обеспечивает клетке устойчивость к нагреванию. Предотвращает сворачивание белком в ходе посттрансляционного транспорта в митохондрии
90	Группа HspC включает Hsp90, Grp94	Обеспечивает поддержание структуры стероидных рецепторов и факторов транскрипции
100	Hsp104, Hsp110	Обеспечивает устойчивость к повышению температуры

левых пептидных антигенов дендритными клетками [47, 89, 90]. С другой стороны, HSP способны также модулировать врожденный иммунный ответ, участвуя в активации NK-клеток [91]. HSP стимулирует продукцию хемокинов и таких провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, как IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α и IFN- γ [92, 93]. Термостабильные белки из семейства HSP активно используют в качестве адъювантов при разработке противоопухолевых вакцин для целого ряда онкологических заболеваний, в частности для рака груди и меланомы [94–98]. Некоторые из этих разработок дошли до третьей фазы клинических исследований [99]. Проводятся I и II фазы клинических исследований терапевтических вакцин, содержащих Heat Shock Protein Peptide Complex-96 (HSPPC-96) для лечения глиобластомы [100]. Показана принципиальная возможность использования HSP, конъюгированных с наночастицами оксида железа и золота, для противоопухолевой вакцинации [98, 101]. Кроме того, изучается потенциальное использование HSP для усиления эффектов химио-, радио- и иммунотерапии [102, 103]. На рис. 5 представлены механизмы участия HSP в иммунотерапии рака [102].

Противораковые вакцины на основе HSP показали свою эффективность против ряда опухолей, экспрессирующих антиген, поскольку они не только способствуют поглощению антигенов, но также запускают активацию T-лимфоцитов.

Лучшее понимание роли HSP в модуляции микроокружения опухоли сможет помочь в разработке более эффективных иммунотерапевтических стратегий. В частности, безопасность и эффективность противоопухолевых вакцин были улучшены за счет комбинированной терапии, включая использование шаперонов. Ожидается, что иммунотерапия на основе HSP останется основным направлением в лечении рака [102].

Новый подход в медицине, заключающийся в комплексном решении терапевтических проблем — одновременное создание лечебного препарата и средства ранней диагностики соответствующего заболевания, получил название тераностика. И хотя сам термин “тераностика” появился сравнительно недавно, эта область быстро развивается как самостоятельная ветвь наноплазмоники и наномедицины [104–106]. Недавно было показано, что HSP секретируются раковыми клетками через экзосомы. Эти экзосомы могут использоваться в качестве циркулирующих маркеров. HSP-экзосомы являются биомаркерами диссеминации рака и ответа на терапию. Для этих внеклеточных HSP был описан новый ряд функций, в основном, в модуляции противораковых иммунных ответов. Обнаруженные функции HSP-экзосом делают их как мишенями для противоопухолевой терапии, так и биомаркерами для мониторинга заболевания [107, 108].

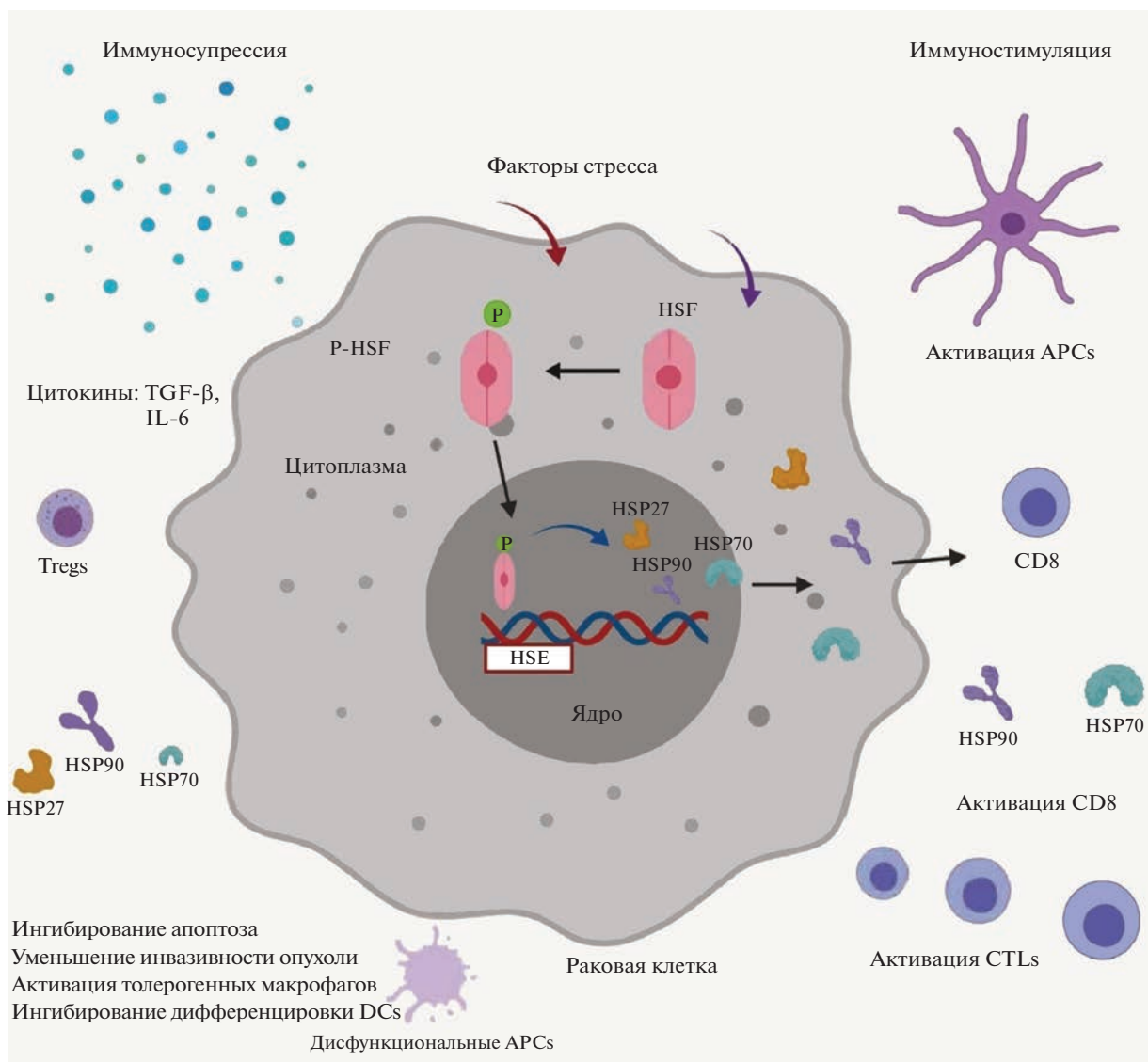


Рис. 5. Механизмы участия HSP в иммунотерапии рака. Раковые клетки подвергаются воздействию нескольких факторов стресса из внеклеточной среды микроокружения опухоли. Эти стрессовые факторы активируют транскрипционные факторы теплового шока, способствуя их диссоциации от HSP и их фосфорилированию. Затем факторы транскрипции теплового шока перемещаются в ядро, где они связываются с элементами теплового шока и инициируют транскрипцию HSP, таких как HSP27, HSP70 и HSP90. HSP экспортируются в микроокружение опухоли, модулируя иммунный ответ против раковых клеток. В иммунодепрессивных состояниях HSP повышают выживаемость и пролиферацию раковых клеток, активируя их механизм клеточной защиты. HSP могут также стимулировать противораковый иммунный ответ в оптимальных условиях, тем самым поддерживая тонкий баланс между гибелью клеток и выживанием [102].

Главными проблемами в диагностике и лечении опухолей являются раннее выявление ракового заболевания, а также прогнозирование течения заболевания и ответа на противоопухолевую терапию. Раннее выявление рака предназначено для обнаружения злокачественных заболеваний на этапе, когда сами больные еще не замечают никаких клинических признаков. Раннее выявление опухо-

левого процесса способствует улучшению терапевтических и прогностических возможностей при лечении [10, 11] и может быть эффективным только при соблюдении основных условий, таких как:

- обнаружение рака на доклинической латентной стадии;
- обнаружение при помощи безопасных методов;

– обнаружение на той стадии заболевания, когда терапия может повлиять на течение болезни и снизить ее летальность.

В вопросах ранней диагностики рака имеют важное значение инструменты для диагностики *in vitro*. Инструменты для диагностики *in vitro* являются важной частью современной лабораторной медицины, а клиническое применение таких инструментов проходит через весь процесс диагностики и лечения заболеваний, включая профилактику заболеваний, предварительную диагностику, выбор плана лечения и эффективность его оценки, предоставляя врачам большое количество полезной клинико-диагностической информации, становятся все более важным компонентом диагностики заболеваний и лечения [109]. Одним из таких направлений является развитие методов онкодиагностики биомаркеров, в том числе HSP [110–112]. Изменение экспрессии HSP может служить важным диагностическим маркером реакции клетки на повреждения. Как уже было сказано, HSP является своеобразным связующим звеном сопряжения стресса на уровне целостного организма и стрессового ответа отдельных клеток [43]. Поэтому разработка методологии диагностики HSP *in vitro* продолжает развиваться во всем мире. Несмотря на то, что положительный результат при определении онкомаркеров не всегда свидетельствует о наличии злокачественного новообразования, на основании положительного результата назначается детальное обследование.

Один из ключевых вопросов при валидации биомаркеров – это потенциальная необходимость использования панели биомаркеров при недостаточности использования одного биомаркера. В ряде случаев множественные биомаркеры более адекватно отражают биологию гетерогенных опухолей и превосходят по эффективности анализы по одному биомаркеру [113]. Наличие различных сопутствующих заболеваний у пациентов также может затруднить точный диагноз, что приводит к необходимости сбора дополнительной информации, которую зачастую можно получить только анализируя панель биомаркеров [113].

Для дальнейшей оценки и внедрения в массовую практику контроля HSP как маркеров онкозаболеваний, исследования должны развиваться в 2-х основных взаимосвязанных направлениях:

– изучение разнообразия HSP и изменения их уровня при разных видах онкопатологий;

– развитие методов *in vitro* диагностики HSP, как маркеров онкозаболеваний, в том числе на основе биосенсорных систем.

Интеграция новых данных о HSP и развитие современных методов их определения, позволят, по нашему мнению, обеспечить лучшие возможности для диагностики, прогнозирования и эффективного лечения рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда (проект № 19-14-00077).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thenrajan T., Wilson J. // Biosens. Bioelectron. X. 2022. V. 12. 100232. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100232>
2. Шевцов М.А., Хачатрян В.А., Маргулис Б.А. // Современная онкология. 2012. Т. 14. № 1. С. 63–68.
3. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. // Int. J. Cancer. 2019. V. 144. № 8. P. 1941–1953.
4. Cui F., Zhou Z., Zhou H.S. // J. Electrochem. Soc. 2020. V. 167. № 3. 037525. doi.org/10.1149/2.0252003JES
5. Crosby D., Bhatia S., Brindle K.M., Coussens L.M., Dive C., Emberton M. et al. // Science. 2022. V. 375. eaay9040. <https://doi.org/10.1126/science.aay9040>
6. Malecka K., Mikuła E., Ferapontova E.E. // Sensors. 2021. V. 21. № 3. P. 736. <https://doi.org/10.3390/s21030736>
7. Anzar N., Hasan M.R., Akram M., Yadav N., Narang J. // Process Biochem. 2020. V. 94. P. 126–135.
8. Kuswandi B., Hidayat M.A., Noviana E. // Biosens. Bioelectron. X. 2022. V. 12. 100246. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100246>
9. Hawkes N. // BMJ. 2019. V. 364. 1408. <https://doi.org/10.1136/bmj.1408>
10. Brenner H., Schrotz-King P., Holleczeck B., Katalinic A., Hoffmeister M. // Dtsch. Arztebl. Int. 2016. V. 113. № 7. P. 101–116. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0101>
11. Kraywinkel K., Buttman-Schweiger N., Benjamin B. // Gesundheitswesen. 2017. V. 79. № 8–9. P. 184.
12. Goyal L., Hingmire S., Parikh P.M. // Med. J. Armed Forces India. 2006. V. 62. № 2. P. 162–168.
13. Pulumati A., Pulumati A., Dwarakanath B.S., Verma A., Papineni R.V.L. // Cancer Rep. 2023. V. 6. e1764. <https://doi.org/10.1002/cnr.21764>
14. Franier B., Thompson M. // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 135. P. 71–81.
15. Первый В.С., Сухой В.Ф. Онкомаркеры. Клинико-диагностический справочник. Ростов-на-Дону: Феникс, 2012. 128 с.
16. Абедев Г.И. // Иммунология. 1994. № 3. С. 4–9.
17. Predictive Biomarkers in Oncology. / Eds. S. Badve, G.L. Kumar. Cham: Springer Nature, 2019. 642 p.
18. Cao D.-L., Yao X.-D. // Chin. J. Cancer. 2010. V. 29. № 2. P. 229–233.
19. Dykman L.A., Staroverov S.A., Fomin A.S., Panfilova E.V., Shirokov A.A., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Khelebtsov N.G. // Gold Bull. 2016. V. 49. № 3–4. P. 87–94.
20. Madu C.O., Lu Y. // J. Cancer. 2010. V. 1. P. 150–177.

21. Kimm M.A., Shevtsov M., Werner C., Sievert W., Zhiyuan W., Schoppe O. et al. // *Cancers*. 2020. V. 12. P. 1331. <https://doi.org/10.3390/cancers12051331>
22. Werner C., Stangl S., Salvermoser L., Schwab M., Shevtsov M., Xanthopoulos A. et al. // *Cancers*. 2021. V. 13. 3706. <https://doi.org/10.3390/cancers13153706>
23. Cavallaro S., Horak J., Hååg P., Gupta D., Stiller C., Sahu S.S. et al. // *ACS Sens.* 2019. V. 4. № 5. P. 1399–1408.
24. Baghbaderani S.S., Mokarian P., Moazzam P. // *Curr. Anal. Chem.* 2022. V. 1. P. 63–78.
25. Mahato K., Prasad A., Maurya P.K., Chandra P. // *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2016. V. 7. № 2. e125. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000e125>
26. Mahato K., Maurya P.K., Chandra P. // *3 Biotech.* 2018. V. 8. P. 149. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1148-8>
27. Nanobiosensors for Personalized and Onsite Biomedical Diagnosis. / Ed. P. Chandra. Stevenage: IET, 2016. 640 p.
28. Purohit B., Vernekar P.R., Shetti N.P., Chandra P. // *Sens. Int.* 2020. V. 1. 100040. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>
29. Kaczor-Urbanowicz K.E., Martín Carreras-Presas C., Kaczor T., Tu M., Wei F., Garcia-Godoy F., Wong D.T. // *J. Cell Mol. Med.* 2017. V. 21. № 4. P. 640–647.
30. Nagler R., Bahar G., Shpitzer T., Feinmesser R. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. № 13. P. 3979–3984.
31. Lindquist S., Craig E.A. // *Annu. Rev. Genet.* 1988. V. 22. P. 631–677.
32. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. // *Mol. Cell.* 2010. V. 40. № 2. P. 253–266.
33. Guisbert E., Herman C., Lu C.Z., Gross C.A. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 22. P. 2812–2821.
34. Herman C., Gross C.A. In: *Encyclopedia of Microbiology.* / Ed. J. Lederberg. N.Y.: Acad. Press, 2000. P. 598–606.
35. Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones.* / Eds. R.I. Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1994. P. 1–30.
36. Whitley D., Goldberg S.P., Jordan W.D. // *J. Vasc. Surg.* 1999. V. 29. № 4. P. 748–751.
37. Ellis J. // *Nature.* 1987. V. 328. № 6129. P. 378–379.
38. Shemesh N., Jubran J., Dror S., Simonovsky E., Basha O., Argov C. et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. 2180. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22369-9>
39. Craig E., Yan W., James P. In: *Molecular Chaperones and Folding. Catalysts*, Ed. B. Bukau. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1999. P. 139–162.
40. Bascos N.A.D., Landry S.J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. 6195. <https://doi.org/10.3390/ijms20246195>
41. Lindner R.A., Treweek T.M., Carver J.A. // *Biochem. J.* 2001. V. 354. P. 79–87.
42. Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tanguay R.M., Bruford Elspeth A. et al. // *Cell Stress Chaperones.* 2009. V. 14. № 1. P. 105–111.
43. Максимович Н.Е., Бонь Е.И. // *Биомедицина.* 2020. Т. 16. № 2. С. 60–67.
44. Rani S., Srivastava A., Kumar M., Goel M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2016. V. 363. № 6. fnw030. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw030>
45. Azad A.A., Zoubeidi A., Gleave M.E., Chi K.N. // *Nat. Rev. Urol.* 2015. V. 12. № 1. P. 26–36.
46. Akerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 545–555.
47. Schlesinger M.J. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 21. P. 12111–12224.
48. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter D., Buchner J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 12. № 10. P. 842–846.
49. Hristozova N., Tompa P., Kovacs D. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 8. e0161970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161970>
50. Muchowski P.J. // *Neuron.* 2002. V. 35. № 1. P. 9–12.
51. Barral J.M., Broadley S.A., Schaffar G., Hartl F.U. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2004. V. 15. № 1. P. 17–29.
52. Liu Z., Xi D., Kang M., Guo X., Xu B. // *Cell Stress Chaperones.* 2012. V. 17. P. 539–551.
53. Tkáčová J., Angelovičová M. // *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2012. V. 45. P. 349–353.
54. Mathew A., Morimoto R.I. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998. V. 851. P. 99–111.
55. Rappa F., Farina F., Zummo G., David S., Campanella C., Carini F. et al. // *Anticancer Res.* 2012. V. 32. P. 5139–5150.
56. Rizzo M., Cappello F., Marfil R., Nibali L., Marino Gammazza A., Rappa F. et al. // *Cell Stress Chaperones.* 2012. V. 17. P. 399–407.
57. Liyanagamage D.S.N.K., Martinus R.D. // *Mediators Inflamm.* 2020. V. 2020. 8073516. <https://doi.org/10.1155/2020/8073516>
58. Gunther S., Ostheimer C., Stang S., Specht H.M., Mozes P., Jesinghaus M. et al. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 556. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00556>
59. Breuninger S., Erl J., Knape C., Gunther S., Regel I., Rödel F. et al. // *J. Clin. Cell Immunol.* 2014. V. 5. № 5. P. 264. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000264>
60. Bayer C., Liebhardt M.E., Schmid T.E., Trajkovic-Arsic M., Hube K., Specht H.M., Schilling D. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014. V. 88. № 3. P. 694–700.
61. Hurwitz M.D., Kaur P., Nagaraja G.M., Bausero M.A., Manola J., Asea A. // *Radiother. Oncol.* 2010. V. 95. № 3. P. 350–358.
62. Abe M., Manola J.B., Oh W.K., Parslow D.L., George D.J., Austin C.L., Kantoff P.W. // *Clin. Prostate Cancer.* 2004. V. 3. № 1. P. 49–53.
63. Takashima M., Kuramitsu Y., Yokoyama Y., Iizuka N., Toda T., Sakaida I. et al. // *Proteomics.* 2003. V. 3. № 12. P. 2487–2493.
64. Feng J.T., Liu Y.K., Song H.Y., Dai Z., Qin L.X., Al-mofti M.R. et al. // *Proteomics.* 2005. V. 5. № 17. P. 4581–4588.
65. Fujita Y., Nakanishi T., Miyamoto Y., Hiramatsu M., Mabuchi H., Miyamoto A. et al. // *Cancer Lett.* 2008. V. 263. № 2. P. 280–290.
66. Syrigos K.N., Harrington K.J., Karayiannakis A.J., Sekara E., Chatziyianni E., Syrigou E.I., Waxman J. // *Urology.* 2003. V. 61. № 3. P. 677–680.

67. *Pick E., Kluger Y., Giltman J.M., Moeder C., Camp R.L., Rimm D.L., Kluger H.M.* // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 7. P. 2932–2937.
68. *Santiago-O'Farrill J.M., Kleinerman E.S., Hollomon M.G., Livingston A., Wang W.L., Tsai J.W., Gordon N.B.* // *Oncotarget.* 2017. V. 9. № 2. P. 1602–1616.
69. *Zhu Y., Tian Q., Qiao N., Cheng Y., Li H.* // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2014. V. 36. № 4. P. 394–396.
70. *Ge H., Yan Y., Guo L., Tian F., Wu D.* // *Onco Targets Ther.* 2018. V. 11. P. 351–359.
71. *Rappa F., Pitruzzella A., Marino Gammazza A., Barone R., Mocciano E., Tomasello G. et al.* // *Cell Stress Chaperones.* 2016. V. 21. № 5. P. 927–933.
72. *Jolly C., Morimoto R.I.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 2000. V. 92. № 19. P. 1564–1572.
73. *Hoang A.T., Huang J., Rudra-Ganguly N., Zheng J., Powell W.C., Rabindran S.K. et al.* // *Am. J. Pathol.* 2000. V. 156. № 3. P. 857–864.
74. *Cornford P.A., Dodson A.R., Parsons K.F., Desmond A.D., Woolfenden A., Fordham M. et al.* // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 24. P. 7099–7105.
75. *van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M. et al.* // *Nature.* 2002. V. 415. № 6871. P. 530–536.
76. *Ciocca D.R., Calderwood S.K.* // *Cell Stress Chaperones.* 2005. V. 10. P. 86–103.
77. *Shi L., Chevolut Y., Souteyrand E., Laurenceau E.* // *Cancer Biomark.* 2017. V. 18. № 2. P. 105–116.
78. *Zaher E.R., Hemida M.A., El-Hashash M.M., El-Sheridy H.G.* // *J. Cancer Res. Treat.* 2018. V. 6. № 2. P. 47–53.
79. *Yang S., Xiao H., Cao L.* // *Biomed. Pharmacother.* 2021. V. 142. 112074. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112074>
80. *Qokoyi N.K., Masamba P., Munsamy G., Kappo A.P.* // *Lett. Drug Des. Discov.* 2021. V. 18. P. 650–665.
81. *Ischia J., So A.I.* // *Nat. Rev. Urol.* 2013. V. 10. P. 386–395.
82. *Di Tommaso L., Franchi G., Park Y.N., Fiamengo B., Destro A., Morengi E. et al.* // *Hepatology.* 2007. V. 45. P. 725–734.
83. *Witkin S.S.* // *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2001. V. 22. P. 249–256.
84. *Albakova Z., Norinho D.D., Mangasarova Y., Sapozhnikov A.* // *Front. Med.* 2021. V. 88. 743476. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.743476>
85. *Chen R., Chen S., Liao J., Chen X., Xu X.* // *Am. J. Transl. Res.* 2016. V. 8. P. 1763–1768.
86. *Arrigo A.P., Paul C., Ducasse C., Manero F., Kretz-Remy C., Viot S. et al.* // *Prog. Mol. Subcel. Biol.* 2002. V. 28. P. 185–204.
87. *Ciocca D.R., Rozados V.R., Cuello-Carrio F.D., Gervasoni, S.I., Matar, P., Scharovsky O.G.* // *Cell Stress Chaperones.* 2003. V. 8. № 1. P. 26–36.
88. *Shevtsov M., Multhoff G.* // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. 171. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00171>
89. *Murshid A., Gong J., Stevenson M.A., Calderwood S.K.* // *Expert Rev Vaccines.* 2011. V. 10. № 11. P. 1553–1568.
90. *Троицкая О.С., Новак Д.Д., Рухтер В.А., Коваль О.А.* // *Acta Naturae.* 2022. T. 14. № 1. C. 40–53.
91. *Multhoff G., Pfister K., Gehrman M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W.* // *Cell Stress Chaperones.* 2001. V. 6. P. 337–344.
92. *Basu S., Srivastava P.K.* // *Cell Stress Chaperones.* 2000. V. 5. P. 443–451.
93. *Tsan M.F., Gao B.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. V. 286. P. C739–C744.
94. *Mazzaferro V., Coppa J., Carrabba M.G., Rivoltini L., Schiavo M., Regalia E. et al.* // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. P. 3235–3245.
95. *Pilla L., Patuzzo R., Rivoltini L., Maio M., Pennacchioli E., Lamaj E. et al.* // *Cancer Immunol. Immunother.* 2006. V. 55. P. 958–968.
96. *Maki R.G., Livingston P.O., Lewis J.J., Janetzki S., Klimstra D., Desantis D., Srivastava P.K., Brennan M.F.* // *Dig. Dis. Sci.* 2007. V. 52. P. 1964–1972.
97. *Bolhassani A., Rafati S.* // *Expert Rev. Vaccines.* 2008. V. 7. № 8. P. 1185–1199.
98. *Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Yakovleva L.Y., Parr M.A., Marchenko Y.Y., Eliseev I. et al.* // *J. Control. Release.* 2016. V. 220. P. 329–340.
99. *Testori A., Richards J., Whitman E., Mann G.B., Lutsky J., Camacho L. et al.* // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. P. 955–962.
100. *Ampie L., Choy W., Lamano J.B., Fakurnejad S., Bloch O., Parsa A.T.* // *J. Neurooncol.* 2015. V. 123. P. 441–448.
101. *Dykman L.A., Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Chumakov D.S., Gabalov K.P. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 22. 14313. <https://doi.org/10.3390/ijms232214313>
102. *Das J.K., Xiong X., Ren X., Yang J.-M., Song J.* // *J. Oncol.* 2019. V. 2019. 3267207. <https://doi.org/10.1155/2019/3267207>
103. *Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q.* // *MedComm.* 2022. V. 3. № 3. e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
104. *Деев С.М., Лебеденко Е.Н.* // *Биоорганическая химия.* 2015. T. 41. № 5. С. 539–552.
105. *Dykman L.A., Khlebtsov N.G.* // *Biomaterials.* 2016. V. 108. P. 13–34.
106. *Odion R.A., Liu Y., Vo-Dinh T.* // *Cancers.* 2022. V. 14. 5737. <https://doi.org/10.3390/cancers14235737>
107. *Albakova Z., Siam M.K.S., Sacitharan P.K., Zigan-shin R.H., Ryazantsev D.Y., Sapozhnikov A.M.* // *Transl. Oncol.* 2021. V. 14. 100995. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100995>
108. *Regimbeau M., Abrey J., Vautrot V., Causse S., Gobbo J., Garrido C.* // *Semin. Cancer Biol.* 2022. V. 86. P. 46–57.
109. *Wang L., Xu W., Wang B., Si X., Li S.* // *Processes.* 2023. V. 11. 403. <https://doi.org/10.3390/pr11020403>
110. *Khalil A.A., Kabapy N.F., Deraz S.F., Smith C.* // *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Cancer.* 2011. V. 1816. P. 89–104.
111. *Staroverov S.A., Kozlov S.V., Brovko F.A., Fursova K.K., Shardin V.V., Fomin A.S. et al.* // *Biosens Bioelectron: X.* 2022. V. 11. 100211. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100211>
112. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A.* // *Biosens Bioelectron.* 2023. V. 222. 114909. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
113. *Дон Е.С., Тарасов А.В., Эпштейн О.И., Тарасов С.А.* // *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017. T. 62. С. 52–59.

Heat Shock Proteins in Cancer Diagnostics

O. I. Guliy^{a, *}, S. A. Staroverov^{a, b}, and L. A. Dykman^a

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms,
Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

^b*Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia*

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

With the growing number of cancers, new assistive tools are required to obtain extensive molecular profiles of patients to help identify the disease. Early diagnosis of cancer is based on the analysis of relevant biomarkers, which can be used to monitor the population in order to identify the disease until it can be determined using standard methods and is not clinically manifest. One of the potential markers of cancer is heat shock proteins that act as molecular chaperones. Changes in heat shock proteins expression can serve as an important diagnostic marker of the cell's response to damage. The paper presents a brief overview of the prevalence of oncological diseases in the world, the need of early oncological diagnostics development, as well as the prospects for the use of heat shock proteins in making an oncological diagnosis.

Keywords: heat shock proteins, cancer diagnostics, chaperones, overexpression, tumor markers

УДК 579.64:57.017.3:57.047:632.93

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА *Bacillus thuringiensis* И НАПРАВЛЕНИЯ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. Р. М. Хайруллин¹ *, А. В. Сорокань¹, В. Ф. Габдрахманова¹, И. В. Максимов¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: krm62@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Одной из актуальных проблем защиты растений от вредителей и болезней является создание экологически безопасных препаратов, применение которых не сопровождалось бы резистентностью целевых объектов биоконтроля. Огромным потенциалом в этом отношении обладают микроорганизмы, среди которых наиболее перспективными являются эндофиты, заселяющие внутренние ткани растений без вреда для растительного организма. Среди таких микроорганизмов бактерии *Bacillus* вызывают особый интерес благодаря их широкому распространению в природе, безопасности многих видов для человека, относительной простоте производства препаратов на их основе. В обзоре рассмотрены свойства *Bacillus thuringiensis*: эндофитность, инсектицидность, антибиотическая активность, продукция регуляторов роста и мобилизация элементов питания растений, индукция устойчивости, а также возможность конструирования новых штаммов с применением методов геномной инженерии.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, эндофиты, биологическая активность

DOI: 10.31857/S0555109923040074, **EDN:** QZCGCS

Патогены и вредители вызывают значительные потери урожая сельскохозяйственных культур. Использование химических средств защиты растений (ХСЗР) с целью избавления от вредящих организмов на полях, в особенности насекомых, стало традиционной практикой современного растениеводства. Несмотря на то, что применение ХСЗР приносит пользу, защищая сельскохозяйственные растения и обеспечивая эффективность земледелия, вместе с тем их использование привело к росту озабоченности потребителей безопасностью для человека и животных как самих ХСЗР, так и получаемых продуктов питания, развитием резистентности вредителей к существующим препаратам и необходимости решения этих проблем.

Альтернативными ХСЗР против вредителей считаются биопрепараты на основе различных видов энтомопатогенных микроорганизмов, в том числе и бактерий *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*), изучение защитных свойств которых начал в Японии инженер-шелковод Ишивата [1], выделив из мертвых гусениц тутового шелкопряда *Bombyx mori* бактерию, названную *Bacillus sotto*. Бактерия была идентифицирована как возбудитель смертельной инфекции этого насекомого – болезни Сотто. Впоследствии ее классифицировали как патовар *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. Спустя

несколько лет в 1911 г. немецкий ученый Эрнст Берлинер [2] в провинции Тюрингия из мертвых личинок мельничной огневки *Anagasta kuehniella* выделил бактерию, получившую название *Bacillus thuringiensis* в честь указанной местности. Затем, в 1938 г. во Франции появился первый коммерческий продукт семейства “Битоксибациллинов”, названный “Spogene” и предназначенный преимущественно для борьбы с амбарными огневками [3]. В 1950 гг. прошлого столетия почти одновременно и независимо в СССР и в США стали появляться первые коммерческие инсектициды на основе *Bt*. В СССР производство первого такого инсектицида – “Энтеробактерина” было освоено на Бердском (Россия) и Степногорском (Казахстан) заводах [4]. В 1949 г. микробиолог Е.В. Талалаев из мертвых личинок сибирского шелкопряда выделил бациллу, названную *Bacillus dendrolimus*, которая впоследствии стала действующим началом биопрепарата “Дендробациллин”, успешно применявшегося для защиты лесов от вредителей. В это же время в США штамм подвита *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* использовался для производства биоинсектицида “Thuricide”. В 1970 г. из гусениц хлопковой моли *Pectinophora gossypiella* Saund., погибших при естественной эпизоотии, был выделен штамм *Ba-*

cillus thuringiensis var. *alesti* HD-1 (серотип H3a3b, subsp. *kurstaki*). Использование этой бактерии для защиты растений от целевых насекомых было почти в двадцать раз эффективнее по сравнению с имеющимися в то время другими биоинсектицидами, что привело к созданию в 1983 г. биопрепарата “Лепидоцид” на основе этого штамма.

В настоящее время в мире в качестве основы биоинсектицидов чаще всего используются штаммы *Bt* подвидов (subsp.) *kurstaki*, *aizawai*, *israelensis*, *tenebrionis*, *thuringiensis*. Благодаря высокой специфичности по отношению к различным вредителям и безопасности для окружающей среды многие исследователи считают препараты на основе *Bt* эффективной и экологически безопасной альтернативой ХСЗР [5]. Более того, *Bt*-препараты разрешены для применения в органическом земледелии как за рубежом, так и в России.

Пестициды на основе *Bt* составляют до 75% мирового рынка продаж биоинсектицидов и около 4% от всех инсектицидов. В России зарегистрированы следующие биопрепараты: на основе *Bt* subsp. *thuringiensis*: “Битоксибациллин”, “Лептоцид”, “Инсетим”; *Bt* subsp. *kurstaki* – “Лепидоцид”, *Bt* subsp. *toumanoffi* – “Биослип” [6]. В Белоруссии известны препараты на основе *Bt* subsp. *dendrolimus* (“Дендроллин”) и *Bt* subsp. *darmstadiensis* (“Бацитурин”) [7].

Несмотря на довольно детальные исследования свойств бактерий *Bt*, распространенность препаратов на их основе и высокую эффективность некоторых из них для защиты растений от определенных видов насекомых, существует ряд дискуссионных вопросов. Анализ современных тенденций в стратегии повышения устойчивости к фитофагам и фитопатогенам и продуктивности сельскохозяйственных культур предполагает необходимость выявления перспективных направлений дальнейшего применения микроорганизмов указанного вида в растениеводстве.

Спорные вопросы таксономии *Bt*. Активное использование препаратов на основе *Bt* привело к тому, что вредители приобретают устойчивость к наиболее часто используемым штаммам, что ставит под угрозу их эффективность и требует поиска новых штаммов и токсинов, обладающих различными механизмами действия и высокой активностью. В связи с этим возникают вопросы идентификации штаммов, а в отношении таксономии некоторых видов бактерий *Bacillus*, в том числе и *Bt*, до сих пор ведутся дискуссии.

Исследования морфологии клеток и спор, физиолого-биохимических свойств с использованием иммунохимических и молекулярно-генетических методов анализа позволили прийти к выводу о наличии серотипов=подвидов (Serovars=Subspecies) *Bt* и провести внутривидовую таксономическую классификацию на основе анализа Н-ан-

тигена жгутиков бактерий. Согласно этой классификации, вид *Bt* включает 69 антигенных групп и 13 подгрупп [8]. Вместе с тем, такое распределение серогрупп не имело четкой связи со специфической инсектицидностью штаммов. Интересно и то, что бактерии этого вида с генами инсектотоксичных белков гомологичными между собой до 90% кодируют белки с различной токсической специфичностью к разным видам насекомых. Например, гены *cryIAa* и *cryIAc* на 84% идентичны друг другу, но только белок *cryIAa* токсичен для шелкопряда (*Bombyx mori* L.), тогда как гены *cry3Aa* и *cry7Aa* идентичны друг другу на 33%, но оба продукта проявляют токсичность против колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say [9].

Молекулярно-генетические методы идентификации представителей *Bacillus* позволили разделить их на кластеры и в соответствии с эволюционным деревом генетического расстояния включить вид *Bt* в один кластер с такими видами, как *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. medusa*, *B. mycooides*, *B. maroccanus*, *B. simplex* и *B. psychrosaccharolyticus*. Другие исследователи, определяя филогенетическое родство между 40 видами рода *Bacillus* и используя последовательности нуклеотидов 16S рДНК и 16S-23S внутреннего транскрибируемого спейсера, в один и тот же кластер с видом *Bt* включили только виды *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides* [10].

Согласно Лю с соавт. [11] *Bt* – продуценты инсектотоксинов, входят в надвидовую группу бактерий *B. cereus*, также называемую как *B. cereus sensu lato* (s.l.), включающую 21 близкородственный вид. Широко известны среди них *B. anthracis*, *B. cereus*, *Bt*, *B. mycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides*, а также недавно идентифицированные *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. bingmayongensis* и *B. wiedmannii*. На основании фенотипических и филогенетических данных авторы выделили еще 9 новых видов бактерий: *Bacillus paranthracis* sp. nov., *B. pacificus* sp. nov., *B. tropicus* sp. nov., *B. albus* sp. nov., *B. mobilis* sp. nov., *B. luti* sp. nov., *B. proteolyticus* sp. nov., *B. nitratireducens* sp. nov., *B. paramycooides* sp. nov.

Несмотря на признание многими авторами *Bt* как отдельного вида, существуют альтернативные мнения в вопросах: является ли *Bt* реальным видом и отдельным членом группы *B. cereus*; относить ли *Bt* к группе бактерий *B. cereus* s.l. или *B. cereus sensu stricto*; следует ли рассматривать *Bt* как самостоятельный вид или подвид *B. cereus*, несущий только соответствующую плазмиду [12]. Особенно много вопросов появилось после полногеномного секвенирования ДНК *Bt*, когда была обнаружена исключительно высокая генетическая близость этого вида с видом *B. cereus* [13], что может привести к сложности их выявления и разделения в пищевых продуктах. В другой работе, основываясь на секвенировании гена 16SPHK *Bt* ATCC 10792T

(ACNF01000156) и *B. paranthracis* Mn5T (KJ812420), была показана наибольшая генетическая близость их друг к другу [13]. Вместе с тем, одним из наиболее четких маркеров, позволяющих отличить вид *Bt* от *B. cereus*, может быть транскрипционный регулятор XRE, контролирующий у *Bt* продукцию большинства белковых кристаллических токсинов [14], что позволило некоторым авторам штаммы *B. cereus s.l.*, продуцирующие инсектицидные кристаллы, отнести к виду *Bt* [15]. Учитывая приведенное выше, в этом обзоре *B. cereus* обсуждается наряду с *Bt*.

Экологические ниши *Bt*. Микроорганизмы рода *Bacillus* относят к типичным представителям почв, а бактерии *Bt*, точно так же, как и *B. subtilis*, считаются “вездесущими”. С начала выделения первого штамма *Bt* исследователи получили множество патоваров этого вида бактерий из трупов насекомых и среды их массового скопления, с поверхности листьев растений, из воды, фекалий животных, почвы, объектов мукомольных заводов и хранилищ зерна [16].

Встречаемость *Bt*, а также близкородственного вида *B. cereus* в различных природных объектах, недостаточное количество работ, четко раскрывающих пути циркуляции бактерий этого вида в природе, аналогично указанным выше разногласиям по таксономии, приводят к разногласиям в определении экологической ниши этого вида бактерии. Одни авторы считают *Bt* космополитной почвенной бактерией со случайной инсектицидной активностью [17], другие относят нишу этих бактерий к филлоплану, считая их мутуалистами по отношению к растениям благодаря инсектицидности [18], третьи склоняются к тому, что *Bt* являются комменсалами кишечной микробиоты насекомых, не вызывающих явных заболеваний, а в/на растениях оказавшихся случайно [19]. При этом возможны два сценария: при строгой инсектицидности дополнительным резерватом так называемой инфекции для растений становятся погибшие насекомые, падающие на поверхность почвы, однако такой способ в эволюционном аспекте постепенно уменьшал бы вероятность успешного распространения *Bt* в окружающей среде. Можно предположить, что для бактерий предпочтительнее выделяться в окружающую среду с экскрементами насекомых, однако по этому сценарию увеличивается популяция насекомых, уничтожающих растения, что по обратной связи может привести к сокращению пищевых ресурсов для фитофагов. Для соблюдения баланса в пищевых цепях может быть “целесообразным” встраивание в геном бактерии плазмид инсектицидности. Когда, где и как это происходит и происходит ли это в растительных тканях не известно.

“Целесообразность” взаимодействия бактерий *Bt* с растениями для сохранения своих свойств и по-

пуляции в природе может демонстрироваться усилением инсектицидной активности штаммов *Bt* под влиянием растительных компонентов. Например, пектин и ксилан модулировали образование биопленки бактерий *Bt* и способствовали повышению их инсектицидности [20]. Образование биопленки с участием растительных экссудатов наблюдали при многократной, искусственной, адаптационной эволюции *Bt* к корневой системе арабидопсиса [21]. В связи с этим изучение представителей *Bt*, эндофитно и мутуалистически взаимодействующих с растениями, представляется актуальным не только с позиции практического использования этих бактерий как потенциальной основы биоинсектицидов, но и для понимания целостной картины взаимоотношений указанной выше триады: растение – насекомое – *Bt*.

Эндофитность. Ткани растений могут быть вполне эффективной природной нишей обитания бактериальных популяций, в том числе и *Bt*. Следовательно, возможность обнаружения новых хозяйственно-перспективных штаммов микроорганизмов (как про-, так и эукариот), в том числе и *Bt*, среди разнообразия эндофитного микробиома растений вероятно в высокой степени.

До недавнего времени было мало известно об эндофитности *Bt*, но факты обнаружения популяций *Bt* на листьях растений, в том числе и древесных [22] предполагали такое свойство. Например, на листьях клевера *Trifolium hybridum* клетки *Bt* наблюдались после того, как растения выросли из семян на почве, обработанной суспензией клеток этой бактерии [23]. В более поздних работах показано, что некоторые из “некоммерческих” штаммов *Bt* не только обнаруживаются в тканях растений, но и способны в таком состоянии вырабатывать кристаллические инсектицидные белки и липопептиды [24], а также фитогормоны и вещества, индуцирующие иммунный потенциал растений против патогенов [25]. Эти данные ставят вполне закономерные вопросы: как *Bt* колонизирует растения; как бактерии этого вида эволюционировали, чтобы убивать насекомых-фитофагов и для чего; как клетки *Bt* перемещаются внутри растений из подземной части в надземную.

Существует мнение, что насекомые и растения можно рассматривать как своеобразных промежуточных хозяев, поддерживающих жизненный цикл *Bt* [26], а наличие плазмиды, кодирующей *Bt*-токсин, периодически способно облегчать прохождение этого цикла в природе. Согласно цитируемой выше работе, находясь в почве, клетки *Bt* способны через ризосферу или иным способом проникать внутрь растения и распространяться по тканям. При поедании насекомыми растений, заселенных такими бактериями, последние попадают в кишечник фитофагов, а затем, вместе с экскрементами, вновь в почву. Предполагается, что таким

путем происходит селективный цикл, поддерживающий популяцию этого вида бактерий в ценозе. Возможность циркуляции *Bt* в природе подтверждается работой Р.Г. Моннерат с соавт. [27], которые выделили бактерии этого вида из внутренних тканей растений хлопчатника, выросшего на поле, где никогда не применяли биопестициды на основе *Bt*.

При обсуждении перспективности использования эндофитных представителей *Bt* для защиты сельскохозяйственных культур возникает вопрос об их распространенности в тканях культурных и дикорастущих растений. Наряду с такими часто встречающимися в растительных тканях видами бактерий, как *B. subtilis*, *B. megaterium* и др., ряд авторов сообщали о присутствии также и представителей *Bt* или близкородственного вида *B. cereus* в микробиоме растений [28]. Бактерии, принадлежащие к группе *B. cereus s.l.*, в том числе и *Bt*, выделены из поверхностно стерилизованных семян фасоли, гороха, кукурузы, тыквы, редиса, ржи, овса, ячменя, сои, сладкого перца, люцерны, а также семян и плодов ряда деревьев и кустарников в микробиоме растений [28]. Согласно цитируемым авторам, среди 43 видов бактерий, выделенных из тканей растений, частота встречаемости *B. cereus*, наряду с *B. megaterium*, была самой высокой (13%). Клетки *Bt* выделялись из поверхностно стерилизованных тканей вегетирующих растений капусты, арахиса [29], хлопчатника, кукурузы [30] кофе [31], женьшеня *Panax notoginseng* [32], банана [33], резуховидки (арабидопсиса) [34], физалиса [35], кордии вильчатой [36]. Манюната с соавт. [37] из тканей стебля проса *Pennisetum glaucum* L. вместе с другими видами бактерий выделили изоляты *Bt*. От общего биоразнообразия видов рода *Bacillus*, выделенных из эндосферы растений сахарного тростника, до 8.9% составлял вид *Bt* [38]. Из 23 эндофитных изолятов бактерий семян кукурузы Пал с соавт. [39] идентифицировали 19 изолятов, относящихся к *Bacillus* sp., в том числе один изолят, отнесенный к *B. cereus* ZMC6. Из эндосферы растений кукурузы, орошаемых промышленными и городскими сточными водами, был выделен изолят *B. cereus* N5 с высокой рост-стимулирующей активностью [40] по отношению к растениям. Идентифицированы *B. cereus* и *Bt* в изолятах, выделенных из цветков, ягод и семян виноградной лозы сорта *Zweigelt clone* GU9 [41] и внутренних тканей листьев чайного куста *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [42]. Эндофитные штаммы *Bt* 58-2-1, 37-1 и YC-1 были выделены из растений озимой пшеницы в Китае [43], штамм *Bt* GS1 изолирован из тканей орляка (*Pteridium aquilinum*) [44]. Совместно со штаммом *B. amyloliquefaciens* P5 штамм *Bt* C3 был выделен из растений кассавы *Manihot esculenta* [24]. Бактерии, принадлежащие группе *B. cereus s.l.*, были выделены из семян

горчицы полевой и цветной капусты после тщательной их поверхностной дезинфекции [45].

С позиции экологической безопасности интересно сообщение [46], что среди изолятов, выделенных из семян томатов и идентифицированных как виды рода *Bacillus*, составляющих до 13% от всего микробиома, обнаружены изоляты *B. cereus* (NCBI: CP034551). При анализе микробиома 26 видов растений Мексики из тканей лаванды (*Lavandula angustifolia*) был выделен штамм *Bt* LBIT-1250L, а из молочая (пуансеттии) (*Euphorbia pulcherrima*) — LBIT-1251P, относящиеся к серотипам *israelensis* и *kurstaki*, соответственно, и характеризующиеся инсектицидностью в отношении личинок комара *Aedes aegypti* и бражника *Manduca sexta* [47]. Выделенный из хлопчатника штамм *Bt* subsp. *kurstaki* HD-1 успешно и повторно заселял это растение, сохраняясь в течение длительного времени в тканях и обладая токсичностью по отношению к гусеницам совки *Spodoptera frugiperda* [27], а также капустной моли *Plutella xylostella* на капусте [48].

Антибиотическая активность *Bt*. Кроме инсектицидной активности многие штаммы *Bt* способны синтезировать антибиотики и фунгистатики, что позволяет на основе таких бактерий создавать биопрепараты с комплексной биологической активностью. Каменек с соавт. [49] изучали влияние токсина штамма *Bt* 202 из коллекции Всероссийского НИИ генетики и селекции микроорганомов (Россия) на устойчивость картофеля сорта Невский к возбудителю фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Оказалось, что препарат, содержащий очищенный δ -эндотоксин указанного штамма *Bt*, эффективнее сдерживал развитие и распространение фитофтороза на растениях в полевых условиях по сравнению с химическим препаратом “Метамил”. δ -эндотоксин также успешно ограничивал развитие заболевания клубней и эффективность его применения была близка к защитному действию флудиоксонила — действующего вещества фунгицида “Максим” компании “Syngenta” (Швейцария).

Из ризосферы кукурузы были выделены штаммы *B. cereus*, обладавшие высокой антигрибной активностью по отношению к грибу *Fusarium verticillioides*, вызывающему фузариозную гниль стеблей кукурузы [50]. Горилюк с соавт. [51] из тканей чистотела *Chelidonium majus* L. выделили 11 изолятов *Bt*, в том числе способных подавлять рост грибов *in vitro*. Например, изолят *Bt* № 6 подавлял рост *Alternaria alternata*, *Chaetomium* sp., *Paecilomyces variotii*, *Aureobasidium pullulans* и *Exophiala mesophila*. Высокой антагонистической активностью против грибов *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* и *Colletotrichum guaranicola* характеризовался штамм *Bt*, выделенный из вегетирующих растений банана [33]. Обнаружено, что эндофитный изолят *B. cereus* REN 3 (из растений риса *Oryza sativa*) проявлял антибиоти-

ческую активность в отношении значительного числа патогенов риса (*Fusarium fujikuroi*, *F. proliferum*, *F. verticillioides*, *Magnaporthe grisea*, *M. salvinii*) [52]. Интересен штамм *Bt* subsp. *darmstadiensis* Н10, основа отечественного биопрепарата “Бацикол”, проявляющий наряду с высокой энтомоцидной активностью, антагонизм по отношению к ряду фитопатогенных грибов [53]. Выделенные из тканей плодов дыни *Cucumis melo* L. эндофитные образцы *Bacillus* spp., в том числе и идентифицированные как *B. cereus*, проявили высокую степень антагонизма к ряду фитопатогенных грибов [54]. Ассоциированный с ризосферой томатов штамм *Bt* В2, продуцирующий бацилломицин, проявлял высокую антагонистическую активность в отношении возбудителя ризоктониоза [55].

Штамм бактерии *B. cereus* YN917 был предложен в качестве средства, стимулирующего рост растений риса и защищающего их от гриба *M. oryzae* [56]. Из поверхностно стерилизованных листьев индийского барбариса *Berberis lycium* выделены 30 изолятов эндофитных бактерий, идентифицированных на основе 16S rPHK как *B. cereus* и *Bt*, обладавших высокой антифунгальной активностью против грибов *Aspergillus niger* (60%) и *A. flavus* (56%) [57]. Штаммы *Bt*, выделенные из тканей пшеницы, защищали растения от стеблевой головни *Urocystis tritici* [45]. Обработка почвы и корневых куркумы *Curcuma longa* L. суспензией клеток рост-стимулирующей бактерии *B. cereus* (штамм RВасDOB-S24) способствовала уменьшению степени поражения растений патогенами *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. и *Rhizoctonia solani* Kuhn., вызывающими корневую и листовую гнили [58]. Авторы показали способность этого штамма бактерии эффективно проникать в ткани корневых культур. Ким с соавт. [59] выделили из почвы штамм *Bt* СМВ26, проявивший противогрибковую активность в отношении возбудителя антракноза перца *Colletotrichum gloeosporioides*. Липопептид, выделенный из бактерии, имел циклическую структуру, подобную фенгицинам, и обладал, в дополнение к фунгицидной, и инсектицидной активностью в отношении личинок капустницы (*Pieris rapae crucivora*).

Описанные выше свойства бактерий *Bt* и их способность стимулировать рост и повышать урожайность сельскохозяйственных культур позволяют использовать биопрепараты на их основе на практике для комплексной профилактической защиты растений не только от вредителей и грибных патогенов, но и для контроля бактериальных болезней. Так, штаммы *Bt* проявляли антибиотическую активность к возбудителям бактериоза огурцов и овса [60], бактериальной гнили томатов [25]. В работе Ислама с соавт. [61] была продемонстрирована возможность использования штаммов *Bt*, выделенных из листьев растений тиса *Taxus brevifolia*, для защиты растений мандари-

на *Citrus unshiu* от бактериальной гнили, вызываемой *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Эти свойства бактерий *Bt* связывают с их способностью синтезировать антибиотики различных семейств. Высокой противомикробной активностью, благодаря продукции фенгицин-подобного липопептида, обладал штамм *Bt* KL1, выделенный из листьев лекарственного растения *Andrographis paniculata* Nees. из Индии [62]. Выделенные из растений фасоли *Phaseolus vulgaris* штаммы бактерии *Bt* ВАС3151 совместно с бактериями *Microbacterium testaceum* ВАС1065, ВАС1100, ВАС2153, *Rhodococcus erythropolis* ВАС2162 проявляли антимикробную активность и подавляли эффекты кворум-сенсинга (Quorum Sensing, QS) бактерий *Pseudomonas syringae* и *Hafnia alvei* [63]. Изолят бактерии *Bt* КМСL07, продуцирующий лактоназу, выделенный из эндемичного растения *Madhuca insignis* (Индия) был способен подавлять QS кворум-сенсинг фитопатогенных бактерий *P. syringae* [64]. Ассоциированные с корнями штаммы *Bt* эффективно защищали растения томата от грибов *Verticillium dahliae* и *V. longisporum* [65], что авторы работы связывают с их способностью синтезировать не только антибиотик бациллобактин, но и хитиназы. Эндофитный изолят *Bt* СНGP12 синтезировал антибиотики фенгицин, сурфактин, итурин, бациллаен, бациллибактин, плантазолин и бацилизин, и проявил высокую антифунгальную активность в отношении гриба *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (FOC), вызывающего увядание нута [66]. Из эндосферы корней подсолнечника (Южная Африка) выделен и идентифицирован стимулирующий рост и продуктивность подсолнечника изолят *B. cereus* T4S, у которого были выявлены гены, кодирующие петробактин, бациллибактин, бацитрацин, цвиттермицин и фенгицин, а также ответственные за мобилизацию фосфатов и фиксацию азота [67].

В то же время, известно, что бактерии *Bt* продуцируют антибиотики, подавляющие размножение других нефитопатогенных бактерий, в том числе и других штаммов *Bt* [68]. Так, например, Фавре и Юстон [69] показали, что бактерии серовара *Bt. subsp. thuringiensis* (HD-2) продуцировали антибиотик турицин, активный против 48 из 56 штаммов *Bt*, а также видов *B. megaterium*, *B. polymyxa* и *B. sphaericus*, но не подавляющий рост штаммов *B. licheniformis* и *B. macerans* и грамотрицательных бактерий. А. Шериф с соавт. [70] экстрагировали из метаболитов *Bt* subsp. *entomocidus* HD110 новый бактериоцин – энтомоцин 110, ингибирующий рост нескольких грамположительных бактерий, включая *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus* и виды *Bacillus*. Показано, что антибиотики, продуцируемые *Bt*, могут отличаться избирательностью действия. Пайк с соавт. [71] очистили из культуры *Bt* subsp. *tochigiensis* HD868 бактериоцин – тоцицин, проявивший бактерицидный эффект против

большинства из 20 типичных штаммов *Bt* и штамма *B. cereus*, но не против дрожжей. Турицин 17, бактериоцин подкласса II_d с молекулярной массой 3.162 кДа, синтезируемый штаммом *Bt* NEB17, выделенным из клубеньков сои, показал высокую антибактериальную активность в отношении большого спектра различных штаммов ризосферных патогенов, но не ризобияльных бактерий, а также бактерий-мутуалистов *Serratia proteomaculans* 1-102, 2-68, *Pseudomonas putida*, *Bacillus licheniformis* Alfa-Rhiz, *B. subtilis* NEB 5 и NEB4 [72]. При этом, обработка растений сои клетками этого штамма *Bt* или турицином 17 способствовали стимуляции их роста и более эффективной адаптации к меняющимся условиям окружающей среды. На основании способности турицина 17 стимулировать адаптивный потенциал растений и наличия антимикробной активности Лю с совт. [73] предлагают этот бактериоцин в качестве основы для создания эффективного препарата универсального двойного назначения.

Фунгицидные и антибактериальные свойства *Bt* могут быть связаны не только со способностью этих бактерий синтезировать антибиотики, но и другие соединения, подавляющие рост фитопатогенов. Ряд авторов отмечают, что внеклеточные хитиназы и хитозаназы *Bt* усиливают целевую активность инсектотоксичных белков, но пока нет никаких доказательств того, что они действительно функционируют синергично [74]. Хитиназная активность изолята *Bt* subsp. *dendrolimus* (HD-548) позволяла сдерживать рост грибов *B. cinerea*, *Alternaria solani*, и *Aspergillus* sp., при этом сохранялись инсектицидные свойства бактерий благодаря продукции энтомотоксичных белков Cyu1Ab и Cyu1Ac [53]. Актуганов с соавт. [75] показали, что олигосахариды хитина и хитозана, образующиеся в результате участия внеклеточных хитиназ и хитозаназ штамма *Bt* subsp. *dendrolimus* B-387, обладали высокой противомикробной и фунгицидной активностью. Мухаммад с соавт. [76] выявили, что бактерии *Bt*, продуценты хитиназы, характеризовались высокой антагонистической активностью по отношению к грибам *C. gloeosporioides* и *Curvularia affinis*. Плебан с соавт. [45] наблюдали ингибирование роста фитопатогенных грибов *R. solani*, *Pythium ultimum*, *Sclerotium rolfsii* на растениях хлопчатника после обработки проростков клетками изолята *B. cereus*, выделенного из семян горчицы полевой. Было выдвинуто предположение, что такое свойство могло проявляться у бактерии благодаря наличию активности хитиназы.

Жизнеспособные клетки эндофитов в тканях хлопчатника сохранялись в течение 72 дней на уровне 2.8×10^5 – 5×10^4 КОЕ/г сырой массы. Наличием высокой хитиназной активности объясняется способность эндофитного штамма *B. cereus* XB177R защищать растения баклажана от бактериального увядания, вызванного *Ralstonia solanacearum* [77].

Изолят эндофитной бактерии *Bt* GS1, выделенный из вай папоротника *Pteridium aquilinum*, характеризовался продукцией хитиназы и индуцировал у растений огурца устойчивость к грибу *R. solani* KACC 40111 (RS), при этом дифференциально активируя в растениях другие защитные белки, например, специфические изоформы гваякол- и аскорбат-пероксидаз, полифенолоксидазы [44].

Взаимодействие *Bt* с фитобиомом. В связи с подавлением роста патогенных и непатогенных бактерий возникает вопрос о взаимодействии *Bt* с полезными микроорганизмами фитобиома, например, ризобиями, обеспечивающими симбиотическую азотфиксацию бобовыми растениями. Анализ работ в этой области изучения инсектицидных бацилл свидетельствует о возможном “тройном” мутуализме *Bt*. Установлено, что эндофиты *Bt* способны колонизировать корни бобовых [78], усиливая их рост и увеличивая на них число клубеньков [79]. Например, Бай с соавт. [80] показали возможность увеличения показателей клубенькообразования, роста и урожайности сои при совместной инокуляции растений штаммом *Bt* NEB17 и штаммом *Bradyrhizobium japonicum* 532С, выделенными из корневых клубеньков сои. Из клубеньков ряда бобовых (*Glycine max*, *Vigna umbellata*, *Macrotyloma uniflorum*, *Phaseolus vulgaris*) были выделены штаммы *Bt* с частотой до 21.4×10^{-4} КОЕ/г в тканях [78–80]. Бишпари и Бишоп [26] показали, что бактерии *Bt* способны колонизировать внутренние ткани растений клевера с плотностью популяции до 1000 КОЕ/г листа при использовании стерильной почвы и до 300 КОЕ/г листа – нестерильной, при совместном посеве семян, обработанных спорами. Селвакумар с соавт. [81] при исследовании микробиома клубеньков пуэрарии дольчатой (*Pueraria thunbergiana*), кормовой и покровной культуры в Северо-Западном регионе Индии, выделили изолят KR-1, отнесенный к виду *Bt*. В клубеньках корней бобовых обнаружены и выделены изоляты *Bt* VRB1 и *Bt* VLG15, имеющие гены семейства *cry-1* и *cry-2* и вызывающие в экспериментах полную гибель личинок первого возраста *Spilosoma obliqua* [79]. Выделенные из клубеньков бобовых растений, произрастающих в Гималаях, четыре эндофитных штамма *Bt* показали различную степень колонизации тканей в зависимости от вида растений (*Lens culinaris*, *Glycine max* L., *Vigna umbellata* *Macrotyloma uniflorum*), а также их возраста. Из семян нута *Cicer arietinum* L. были выделены микроорганизмы, среди которых идентифицирован штамм *Bt* Y2B с высокой инсектицидной и ростстимулирующей активностью, связанной с синтезом сидерофоров, цианистого водорода (HCN), индол-3-уксусной кислоты (ИУК), а также солибилизаторов фосфатов [82].

Приведенные сведения позволяют предположить, что использование биопрепаратов на осно-

ве *Bt*, а также генно-модифицированных *Bt*-культур, может изменять структуру микробной популяции в эндо-, ризо- и филлосфере растений, а также в окружающей его среде непосредственно или опосредовано через растения [83]. Например, показана возможность разрушения Nod фактора симбионта сои *B. japonicum* под воздействием хитиназы, продуцируемой *Bt* subsp. *pakistani* HD 395, что может препятствовать образованию клубеньков на корнях [84]. На основании того, что ряд хитиназ, продуцируемых штаммами *Bt*, проявляют противогрибковые эффекты против патогенных грибов *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia cerealis*, *Rh. solani*, *V. dahliae* и *Bipolaris papendorffii* [85] предполагается возможность нанесения ущерба арбускулярным микоризным грибам под влиянием штаммов *Bt* [86]. Вместе с тем, в научной литературе есть и наблюдения, исключаящие в целом значительное и негативное влияние бактерий *Bt* [87], а также генетически модифицированных *Bt*-культур на микробиом агроценоза [88]. Показано отсутствие влияния белка *cry1Ah* на коэффициент заселения растений кукурузы линии 33-7 эндофитной бактерией *B. subtilis* B916 *gfp* [89]. Точно также не наблюдалось существенного изменения структуры микробиома ризосферы при культивировании *Bt*-кукурузы линии 2A-7, экспрессирующей белки *Cry1Ab* и *Cry2Ab* [90].

Вероятно, противоречивость этих взглядов связана с использованием для обработки растений различных подвидов и даже, может быть, штаммов одного и того же подвида *Bt*. Учитывая эти сведения, можно заключить, что для повышения эффективности защиты растений от специализированных вредных насекомых и, в то же время, для возможности использовать препараты на основе *Bt*, как полифункциональные, следует вести поиск таких эндофитных штаммов, которые бы проявляли не только инсектицидный, но и фунгицидный и бактерицидный эффекты против типичных возбудителей целевой культуры, либо обладали способностью непосредственно или опосредованно, через защитную систему растений, регулировать функционирование факторов вирулентности патогенов, например, относящимся к системе QS.

Одной из ключевых молекул системы QS является N-ацетил гомосерин лактон, синтезируемый такими возбудителями болезней растений, как *Erwinia carotovora*, *Pantoea stewartii*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* [91]. Фактором, приводящими к заболеванию растений, является обильный синтез внеклеточных гидролитических ферментов, капсулярных экзополисахаридов, закупоривающих ксилему у растения-хозяина, а также других веществ. Показано, что синтез факторов вирулентности фитопатогенных бактерий и, соответственно, степень по-

ражения растений зависит от наличия и уровня N-ацетил-гомосерин лактона. Мутанты с дефицитом синтеза этой молекулы были менее вирулентны, по сравнению с дикими формами [91].

Выявлено, что представители *Bt* способны нарушать коммуникации в микробном сообществе благодаря способности к деструкции определенных сигнальных молекул, в том числе и QS. Сообщалось, что фермент *Bt*, разрушающий N-ацетил-гомосерин лактон, эффективно подавлял вирулентность фитопатогенных бактерий благодаря способности нарушать коммуникацию в их популяции (QS). Для оценки такой способности *Bt* подавлять вирулентность фитопатогенных бактерий [92] сконструировали мутантную линию с дефектом синтеза фермента, разрушающего N-ацетил-гомосерин лактон. Выяснилось, что мутантные бактерии *Bt* менее эффективны в подавлении симптомов мягкой гнили, вызванной бактерией *E. carotovora*. Авторы сделали заключение, что ферменты деструкции N-ацетил-гомосерин лактона *Bt* важны в процессе подавления кворума у грамотрицательных бактерий без изменения плотности и структуры их популяции. Действительно, перенос гена N-ацетил-гомосеринлактоназы (*aiiA*), ингибирующего выработку сигналов, чувствительных к кворуму, из *Bt* в геном эндофитного штамма *Burkholderia* sp. KJ006 способствовал снижению уровня заболеваемости *in situ* растений риса бактерией *B. glumae* [93].

Стимуляция роста и регуляция гормонального баланса растений. Кроме описанных выше свойств *Bt* значительное внимание исследователи уделяют их способности стимулировать рост растений и продуцировать фитогормоны. Линии *B. cereus* (ECL1) и *Bt* (ECL2), обладающие стимулирующей рост растений активностью, были выделены из корневищ растений *Curcuma longa* L. [94]. Высокой рост-стимулирующей активностью в отношении растений сои и кукурузы, а также томатов [95] обладал продуцирующий ауксин эндофитный штамм *Bt* RZ2MS9, выделенный из корней гуараны *Paullinia cupana*. Армада с соавт. [96] выявили стимуляцию роста растений лаванды *Lavandula dentata* при обработке их спорами бактерий *Bt* и арбускулярных микоризных грибов *Archaespora trappei*, *Glomus versiforme* и *Paraglomus oculatum*. Продуцирующие ауксин эндофитные штаммы *Bt* обнаружены в тканях тропического растения *Withania somnifera* [97] и фасоли [98]. Из растений адатоды сосудистой *Adhatoda vasica*, произрастающей в Юго-Восточной Азии, был выделен штамм *Bt* A₁B₃, способный в больших количествах (до 27.7 мкг/мл) продуцировать ауксин в жидкой среде [99]. Свойством не только продуцировать ауксины, но и фиксировать азот характеризовался эндофитный изолят *Bt*, выделенный из проростков риса *Oryza sativa* L. [100].

О том, что бактерии *Bt* имеют гены, ответственные за синтез ИУК, свидетельствует работа Фигейреда с соавт. [101], в которой нокаут в клетках штамма *Bt* RZ2MS9 гена *ipdC*, отвечающего за триптофановый путь синтеза ИУК, привел к падению уровня ауксина, синтезируемого мутантом *Bt* RZ2MS9 *ipdC*, снижению его рост-стимулирующей активности в отношении растений кукурузы, а также уменьшению плотности популяции в растительных тканях. С использованием диагеотропного (нечувствительного к экзогенному воздействию ауксинов) мутанта (*dgt*) томатов (*Solanum lycopersicum*) сорта Микро-Том и продуцирующего ауксины штамма *Bt* RZ2MS9 непосредственно показано вовлечение бактериальных ауксинов в стимулирующий рост растений эффект бактерий [95]. Из растений хлопчатника и капусты были выделены продуцирующие ауксин линии *Bt*, токсичные для совок *Spodoptera frugiperda* и *P. xylostella*, соответственно [102]. Авторами цитированной работы выдвигается предположение, что способность успешно колонизировать ткани растений клетками *Bt* может быть связана с эффективным функционированием генов, кодирующих индолпируват-декарбоксилузу, регулирующую выработку ИУК растениями [102]. Полученные данные позволяют предположить, что синтезируемые *Bt* ауксины необходимы не только для обеспечения жизнедеятельности растения, как экологической ниши бактерий, но и для колонизации такими бактериями растительных тканей.

Интересны также работы, обсуждающие вопросы контроля эндофитными штаммами *Bt* уровня фитогормонов в растениях, например, этилена [103]. Так, установлено, что штаммы *Bt* SNKг10 (выделен из филосферы шпината) [104] и *B. cereus* AKAD A1-1 (выделен из ризосферы сои) [105] способны синтезировать 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазу (АЦК-дезаминазу) и, таким образом, влиять на синтез этилена в растительных тканях. Обнаружено, что штамм *Bt* PM25 превращал 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК) в аммиак и α -кетобутират в корнях растений и таким образом ограничивал синтез этилена [106].

Бактерии *Bt* способны не только регулировать уровень продукции этилена, но влиять также на продукцию растениями других летучих соединений и синтезировать собственные. Например, изменения в профиле растительных летучих органических соединений обнаружены при обработке растений кукурузы клетками *Bt* RZ2MS9 [107]. Летучие соединения, вырабатываемые эндофитным штаммом бактерии *Bt*, выделенным из собранных в местности Тебулба в регионе Сахель (Тунис) плодов томата черри, проявили антифунгиальную активность против возбудителя серой гнили плодов [108]. Показано, что диметилдисульфид, вырабатываемый штаммом бактерии *B. cereus* C1L,

проявлял свойства элиситора и защищал растения табака и кукурузы от грибов *B. cinerea* и *Cochliobolus heterostrophus* [109].

Формирование устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам и ремедиация окружающей среды с помощью *Bt*. Обширная область применения эндофитов связана также и с необходимостью экологически безопасного усиления адаптивного потенциала растений к быстро меняющимся условиям окружающей среды, фиторемедиации загрязненной тяжелыми металлами почвы, деградации органических токсических соединений в почве, растениях и в воздухе. Несмотря на то, что точные механизмы повышения адаптивности растений к абиотическим факторам среды ростстимулирующими бактериями, в том числе и эндофитными, остаются во многом предположительными, но вместе с тем объяснения такого эффекта включают: (1) продукцию регулирующих рост растений гормонов, таких как абсцизовая кислота, гибберелловая кислота, цитокинины и ауксин; (2) синтез АЦК-дезаминазы для снижения уровня этилена в растениях; (3) индукцию системной устойчивости растений синтезируемыми бактериями соединениями; (4) образование бактериальной биопленки, то есть внеклеточного матрикса. Вероятно, формирование адаптивного потенциала растениями под влиянием бактерий происходит в режиме реального времени, и более эффективными оказываются штаммы бактерий, выделенные из растений, подвергшихся определенному стрессу, например, засухе [110] и преодолевших их действие. Сообщается, что выделенные из африканского проса (*Pennisetum glaucum* L.), подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) бактерии *Bacillus* sp., в том числе и *Bt*, способствовали усилению устойчивости растений кукурузы к засухе [111]. Выделенный из корней сои эндофитный штамм *B. cereus* AKAD A1-1, синтезирующий АЦК-дезаминазу, при воздействии на растения усиливал их устойчивость к осмотическому стрессу [105].

Особый интерес вызывают исследования [110], в которых штамм *Bt* AZP2 – эндофит корней сосны желтой *Pinus ponderosa* (Аризона, США), выращенной в условиях сильного дефицита питательных веществ и засухи, теплового и ультрафиолетового стресса, стимулировал устойчивость к дефициту влаги растений пшеницы. Выделенный из корней сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* изоллят *Bt* GDB-1 стимулировал рост ольхи твердой *Alnus firma* в условиях высокого уровня загрязнения почв тяжелыми металлами (As, Cu, Pb, Ni и Zn), при этом способствуя накоплению ионов в растениях, что можно использовать для ремедиации загрязненных территорий [112]. Использование эндофитных бактерий *Bt* на посевах риса, произрастающих на почвах, загрязненных мышьяком, способствовало толерантности растений

и снижению уровня накопления в зернах ионов этого токсичного металла [113]. Обнаружено формирование толерантности растений *Brassica nigra* к ионам Cr^{+3} под влиянием бактерии *B. cereus* на загрязненных хромом почвах [114]. Инокуляция *Broussonetia papyrifera* L. суспензией клеток *B. cereus* NM5 и *Bt* NM7 увеличивала поглощение ионов марганца растениями, способствуя поддержанию физиологических функций корней и уменьшая силу окислительного стресса [115]. Комплексная обработка растений перца *S. annuum* штаммом *Bt* IAGS 199 и путресцином уменьшала фитотоксический эффект, вызванный кадмием [116]. Высокую антиоксидантную активность, например, в отношении радикалов 1,1-дифенил-2-пикрилгидрацила, проявлял экзополисахарид эндофитного штамма *B. cereus* SZ-1, выделенного из растений полыни *Artemisia annua* L. Обработка растений этим экзополисахаридом приводила к уменьшению степени повреждения ДНК у клеток PC12 пероксидом водорода [117]. Обнаружено, что галотолерантный штамм *Bt* PM25 способствовал лучшему росту растений кукурузы на засоленных почвах, в том числе и благодаря высокой антиоксидантной активности бактериальных метаболитов [106]. Эндофитная бактерия *B. cereus* SA1, способствующая росту растений, увеличивала термотолерантность сои.

Интересна информация об обнаружении у эндофитных штаммов *B. cereus* способности в метабиомной системе растение—микроорганизм очищать воздух от озона [118], формальдегида [119], этилбензола [120]. В условиях гидропоники растения драцены *Dracaena sanderiana*, инокулированные композицией клеток бактерий *Bt* и *Pantoea dispersa*, удаляли бисфенол А — одно из наиболее распространенных соединений, разрушающих эндокринную систему [121]. Интересна информация о способности почвенного штамма *B. cereus* СВ4 из провинции Сычуань (Китай) деградировать один из распространенных и активно используемых в полевых условиях гербицид глифосат [122]. Это открывает перспективы обнаружения эндофитных, не контаминирующих почву форм бактерий, которые способствовали бы снятию гербицидного стресса в ценозах. Из листьев *Garcinia xanthochytmus* был выделен изолят бактерии, идентифицированный как *B. cereus*, обладавший, наряду с антибактериальной активностью против *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* и *Klebsiella pneumoniae*, способностью формировать наночастицы серебра [123]. Образованные с использованием *Bt kurstaki* биосовместимые наночастицы серебра проявили высокую комплексную инсектицидность против личинок *Trichoplusia ni* (Hübner) и *Agrotis ipsilon* [124]. Инокуляция растений штаммом приводила к сверхэкспрессии реагирующих на стресс генов *GmLAX3*, *GmAKT2 SA1*, снижала уровень генерации АФК и

модулировала факторы, формирующие устойчивость растений в условиях температурного стресса [125]. Учитывая визуально наблюдаемый антистрессовый характер воздействия ряда эндофитных штаммов *Bt* на растения в некоторых работах предлагается даже использование их для, например, акклиматизации саженцев бананов [126]. Показано, что ризосферные и эндофитные штаммы бактерии *B. cereus* CSR-B-1 и *Bt* CSR-B-3 в условиях высокой концентрации натрия могут быть эффективными регуляторами роста гладиолуса и биомелиорантами, и этому способствует индукция микробными клетками в растениях супероксиддисмутазы, фенилаланинлиазы, каталазы и пероксидазы [127].

Инсектотоксичные белки. В 1956 г. было показано [128], что инсектицидные свойства бактерий *Bt* проявляются благодаря наличию у них кристаллических белковых включений, из которых наиболее известными являются инсектотоксические параспоральные δ -эндотоксины семейства цитолитических (Cyt) и кристаллических (Cry) белков, которые вызывают гибель более 3000 видов насекомых из 16 отрядов, а также клещей, простейших, гельминтов и нематод. В настоящее время идентифицировано не менее 700 последовательностей генов, кодирующих инсектицидные белки Cry, являющихся их носителями в плазмидном геноме различных штаммов *Bt*. Продукты этих генов обычно накапливаются в компартментах бактериальных клеток с образованием кристаллических включений, на долю которых может приходиться от 20 до 30% сухой массы спорулирующих клеток [128]. Масштабные исследования свойств белков Cry позволили выявить избирательную инсектотоксичность некоторых из них по отношению к представителям насекомых *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Rhabditida*, *Hemiptera*, *Hymenoptera*, *Gastropoda*, что послужило одним из критериев их классификации. Белки CryI, например, проявили токсичность для *Lepidoptera*, CryII — *Lepidoptera* и *Diptera*, CryIII — для *Coleoptera*, CryIV — исключительно для *Diptera*, CryV — *Lepidoptera* и *Coleoptera* [129].

Бактерии *Bt* продуцируют также токсины, синтезирующиеся во время вегетативной фазы роста клеток и получившие названия Vip (от Vegetative insecticidal protein) и Sip (Secreted insecticidal protein). Vip-белки подразделялись первоначально на четыре семейства Vip1, Vip2, Vip3 и Vip4. Согласно новой системе классификации, Vip1 и Vip4 были переименованы в Vpb1 и Vpb4, белок Vip2 был отнесен к группе белков Vpa. Белки Vip3 с многодоменной структурой классифицировались как Vip. Таким образом, ранее классифицированные четыре типа Vip-белков были разделены еще на три класса, как Vpa, Vpb и Vip [130]. Белки Vip1, Vip2 и Sip содержат консервативные сигнальные последовательности, расщепляющиеся до секреции

или после ее завершения. Токсины Vip1 и Vip2 обладают высокой инсектицидной активностью против ряда видов жесткокрылых (*Coleoptera*) и тлей (*Hemiptera*), а белки Vip3 смертельны для чешуекрылых (*Lepidoptera*). Инсектицидная активность белков Vip4 детально не исследована. Известно, что эти белки филогенетически близки к белкам Vip1, в сравнении с представителями Vip2 и Vip3. Белки Sip проявляют токсичность к личинкам жесткокрылых [131].

Кроме описанных токсичных соединений бактерии *Bt* активно синтезируют губительные для ряда эукариот экзотоксины: α -экзотоксин (фосфолипаза C), небелковый термостабильный β -экзотоксин или тюрингеинсин (*thuringeinsin*), который токсичен в отношении клеток насекомых и млекопитающих, в том числе и человека, γ -экзотоксин (токсичен для насекомых-пилильщиков), экзотоксин — фактор гибели вшей (активен только против вшей), экзотоксин — фактор гибели мышей (токсичен для мышей и чешуекрылых насекомых) [132]. Токсичность термостабильных β -экзотоксинов ограничивает использование штаммов *Bt* [133]. Вместе с тем, есть современные технологии редактирования генома *Bt* на основе платформы CRISPRCas9 [134], которые могут быть предложены для отключения синтеза таких токсинов.

В связи с отмеченным выше представляет интерес наличие токсичных, например, в отношении нематод, штаммов среди эндофитных представителей *Bt*. Из плодов клубники *Fragaria ananassa* и восточной хурмы *Diospyros kaki* L. были выделены штаммы *B. cereus* BCM2 и *B. cereus* SZ5, проявляющие высокую нематодцидную активность против *Meloidogyne incognita* на растениях томатов [135]. Обработка растений томатов эндофитным штаммом *Bt* AK08 приводила к смертности 95.46% нематод *Meloidogyne* sp. что, как полагают авторы, связано с синтезом холест-5-ен-3-ол(3.бета.)-карбонохлоридата, обладающего нематодцидной активностью [136]. В работе Лианг с соавт. [137] показано, что высокая нематодцидная активность штаммов *Bt* GBAC46 и *Bt* NMTD81, выделенных из растений Цинхай—Тибетского плато Китая, может объясняться как свойствами самих бактерий, так и индукцией под их влиянием защитной системы растений риса против нематоды *Aphelenchoides besseyi*.

Использование композиции штаммов *B. amyloliquifaciens* FR203A, *B. megaterium* FB133M, *Bt* FS213P, *Bt* FB833T, *B. weihenstephanensis* FB25M, *B. frigoritolerans* FB37BR и *Pseudomonas fluorescens* FP805PU в защите растений винограда сорта Каберне Совиньон против нематод *Xiphinema index* и *Meloidogyne ethiopica* показало эффективность, сравнимую с действием химического нематодцида [138]. Показано, что нематодцидность *Bt* для молодежи

второй стадии развития ризосферной нематоды *M. hapla*, ухудшающая их последующие репродуктивные свойства, а также эффективность проникновения в корни томатов, связана с синтезом белка Cry6A [139], а у штамма *Bt* BRC-XQ12 по отношению к нематоду хвойных *Bursaphelenchus xylophilus* — белка Cry1Ea11 [140].

К началу 1980 гг. гены, кодирующие кристаллические *Bt*-токсины, были обнаружены на трансмиссивных плаزمиде. Определение последовательности генов, кодирующих инсектицидные белки *Bt*, позволило сформировать еще одно направление защиты растений от вредителей — использование генетического материала бактерий этого вида для создания устойчивых трансгенных культур к целевым насекомым.

Первыми клонировали ген кристаллического токсина Cry из *Bt* subsp. *kurstaki* и экспрессировали его в кишечной палочке *Escherichia coli* Шнепф и Уайтли [141], а с 1996 г. на полях стали выращиваться генно-модифицированные растения с использованием *Bt*-культуры, приведшие к “генной” революции в растениеводстве. К началу XXI в. во всем мире активно культивировались *Bt*-кукуруза, *Bt*-хлопчатник, *Bt*-баклажан и *Bt*-картофель, что позволило в ряде стран значительно уменьшить объем применяемых ХСЗР [142, 143]. Считается, что растения, модифицированные для экспрессии инсектицидных белков из *Bt* (называемые *Bt*-защитными растениями), обеспечивают безопасный и высокоэффективный метод борьбы с насекомыми, что позволяет получать высокие урожаи, например, хлопка и зерна кукурузы без применения высоких доз пестицидов [142]. В настоящее время мировым лидером в выращивании *Bt*-культур являются США, наиболее быстрым внедрением их в растениеводство отличаются Китай и Индия.

Внедрение бактериального гена, кодирующего инсектицидные белки *Bt* в геном растительной клетки, позволяет формировать у растений свойство устойчивости к вредителям на протяжении всего вегетационного периода и избежать конкурентной элиминации бактерий *Bt* другими видами микроорганизмов при использовании жизнеспособных спор и клеток этих бактерий в качестве инсектицидов, а в случае использования только кристаллического токсина — разрушения его под действием различных факторов окружающей среды, в частности солнечного ультрафиолетового излучения [143].

Несмотря на успешное распространение по всему миру *Bt*-культур уже давно возникли и обсуждаются вопросы биобезопасности производства продукции растениеводства с их использованием, а также появления резистентных форм вредных насекомых [144]. В то же время, для четкого отделения *Bt*-продукции от продукции тра-

диционных сортов сельскохозяйственных культур в большинстве стран требуется специальная маркировка [145]. Для преодоления резистентности насекомых, например, обсуждается необходимость внедрения в производственный цикл ГМ-растений, содержащих уже более двух генов, кодирующих инсектицидные белки. Например, хлопчатник сорта Bollgard ограничивает жизнеспособность вредителей, таких как *Pectinophora gossypiella* и *Helicoverpa zea* благодаря внедрению в геном хлопчатника гена *Cry1Ac* от *Bt*. Растения же сорта Bollgard II, экспрессирующие два эндотоксина *Bt*, стали устойчивее уже к более широкому кругу насекомых, расширяя спектр защиты от чешуекрылых вредителей [146]. *Bt*-хлопчатник, обладающий тремя защитными генами (1Ac + Cry2Ab + Vip3A), (Cry1Ab + Cry2Ac + Vip3Aa19) или (Cry1Ac + Cry1F + Vip3A), в Австралии культивировали в сезон 2016–2017 г. на более, чем 90% площадей, занятых этой культурой [147].

В настоящее время ведутся интенсивные работы по созданию ГМ-растений, содержащих не только гены *Cry*, но и содержащие другие нуклеотидные последовательности с целью повысить эффективность биологической защиты растений от вредителей. Недавно агентство по охране окружающей среды США одобрило трансгенную кукурузу SmartStaxPRO, экспрессирующую белок Cry3Bb1, против западного кукурузного жука *Diabrotica virgifera* и дцРНК (двухцепочечную РНК), нацеленные против вакуолярного белка DvSnf7, что увеличило смертность целевого вредителя до 80–95% при питании модифицированными растениями [144]. В другой работе в геном трансгенного *Bt*-хлопчатника был внедрен вектор, содержащий информацию о дцРНК, нацеленной против гена ювенильного гормона (кислая метилтрансфераза) хлопковой совки *Heliothis armigera*, что помогло защитить посевы и отсрочить развитие резистентности вредителя к *Bt* в отличие от растений, экспрессирующих только инсектотоксичные белки [148].

Таким образом, классическое использование генов *Bt* для модификации растительного генома постепенно сменяется комбинацией их с другими нуклеотидными последовательностями, или, как сообщается далее, изменением в геноме самих представителей этого вида бактерий.

Рекомбинантные эндофитные бактерии. Одним из перспективных направлений создания современных комплексных активных биопрепаратов, как альтернативы возделыванию ГМ-растений, может быть конструирование бактериальных гибридных рекомбинантных инсектотоксинов с широким спектром действия и повышенной токсичностью к целевому объекту с использованием метода сайт-направленного мутагенеза, например, посредством замены в *Cry*-белке бактерии *Bt* до-

мена III на подобный токсин, обладающий целевой специфичностью. В настоящее время рекомбинантные генно-инженерные конструкции позволяют модифицировать/дополнять/переносить целевые гены инсектотоксинов в другой штамм *Bt* или штамм другого вида бактерий. Полученные такой генетической рекомбинацией *Cry*-токсины, в исходной форме с низкой специфичностью, например, к малой совке *Spodoptera exigua*, включая Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba и Cry1Ea, становились высокотоксичными [149]. Сайт-направленная замена аминокислотного остатка (а.о.) 450-612 участка молекулы Cry1Aa-токсина на подобные из Cry1Ac-токсина приводила к почти 300-кратному усилению токсичности Cry1Aa в отношении табачной огневки *Heliothis virescens* [150]. Мутация (H168R) в спирали α -5 домена I Cry1Aa-токсина приводила к трехкратному увеличению токсичности этого белка для личинок каролинского бражника *Manduca sexta* [151] по сравнению с исходным. Обнаруженные две мутации N372A или N372G в домене II и III токсина привели к восьмикратному усилению инсектотоксичности Cry1Ab к непарному шелкопряду *Lymantria dispar*, а уже тройная замена а.о. по N372A, A282G и L283S увеличивала эту токсичность в 36 раз [152].

Одним из способов улучшения инсектицидной активности токсинов *Bt* является получение рекомбинантов, продуцирующих данные белки. Например, показано усиление инсектицидной активности энтомопатогенной бактерии *Photobacterium temperata* K122 к мельничной огневке *Ephesia kuehniella* и хлопковой совке *Spodoptera littoralis* гетерологичной экспрессией гена *Btvip3LB* [153] или к оливковой моли *Prays oleae* экспрессией генов *Btcry1Aa* и *Btcry1Ia* [154]. Ян с соавт. [155] показали, что накопление химерного белка Cry1Ac-Av3 (нейротоксин *Anemonia viridis*) усиливает инсектицидную активность против *H. armigera* в 2.6 раза по сравнению с исходным Cry1Ac. В другом исследовании химерный белок из Cry1Ac и пептидного токсина HWTX-XI яда паука *Ornithoctonus huwena* усиливали инсектицидность против *H. armigera* и *S. exigua* по сравнению с Cry1Ac [156].

Еще до того, как стала доступна эффективная трансформация клеток *Bt* дополнительными белками, расширяющими спектр биопрепаратов на их основе, гены *Cry* белков были введены в геном бактерий *E. coli*, *B. subtilis*, *B. megaterium* и *Pseudomonas fluorescens* [157]. Можно расширить эффективность биопрепаратов внедрением в геном одного из штаммов *Bt*, уже являющегося основой эффективного биопрепарата, генов, кодирующих белки, способствующие повышению устойчивости к иным видам биотического и абиотического стресса. При этом представляется интересным создание эндофитов (*Bt* или других видов), которые, заселяя внутренние ткани растений и сохра-

няясь там, способствовали бы их большей активности против целевых вредителей.

Гены, кодирующие Vt-токсины, были трансформированы в бактерии *E. coli*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *Clavibacter xyli*, *Herbaspirillum seropedicae*, *R. leguminosarum* [128, 141, 158]. Такие линии бактерий, усиленные переносом в их геномы генов, кодирующих Cry-токсины *Bt*, активно используются за рубежом как основы препаратов “Agree” и “Desine” (“Thermo Triligy”, США), “Condor”, “Cutlass”, “CRYMAX”, “Leptinox” и “Raven” (“Ecogen”, США). С использованием рекомбинантов *P. fluorescens*, в конце XX века созданы, биопрепараты “M-Cap^{TMb}”, “MVP^{®b}”, “M-One Plus^b”, “MattchTM” и “M-Press[®]” (“Mycogen Corporation”, США) [159]. Рекомбинантный штамм *P. fluorescens* стал основой для биопестицида “CellCapTM” (“Mycogen Corporation”), содержащего инкапсулированные Cry-токсины, лучше сохраняющиеся в окружающей среде, в сравнении с исходными [160]. С использованием рекомбинантных линий *Escherichia coli* (BL21C⁺) получены кристаллы токсина Cry2Ac7, проявившие инсектицидность в отношении хлопковой совки *Helicoverpa armigera* [161]. Рох с сотр. [162] был получен рекомбинантный штамм бактерии *B. brevis*, содержащий ген *Bt cry 11a*, который проявил инсектицидную и противомикробную активность. Ген *cry1Ac7* штамма *Bt* 234 был использован для трансформации эндофитной бактерии *H. seropedica*, заселяющей ткани сахарного тростника, что привело к эффективной защите от личинок огневки *Eldana saccharina*.

Бактерии рода *Bradirhizobium*, содержащие ген токсина из *Bt*, защищали корни растений от личинок мухи *Rivellia angulata* [163]. Ген, кодирующий Cry-белок *Bt* subsp. *tenebrionis* (65 kDa), токсичный для жесткокрылых, был введен в *R. leguminosarum*. Клеточный экстракт данных бактерий был токсичен для личинок шавелевого листоэда *Gasterophysa viridula* и клеверного долгоносика *Sitona lepidus*. Инокуляция этой бактерией корней гороха и белого клевера позволила снизить ущерб от почвенных насекомых [164].

Сотрудники фирмы “Монсанто” (США) с использованием транспозонов *tn5* перенесли ген *Bt cry1Aa* из *Bt* ssp. *kurstaki* HD-1 в хромосомный геном бактерии *P. fluorescens* [165] и на растениях кукурузы показали, что штамм близок к донорному по инсектицидности к подгрызающим совкам *Agrotis ipsilon*. Внедрение в геном эндофита *Burkholderia pyrrocinia* JKSH007 гена *Bt cry218* и последующая обработка шелковицы этим штаммом приводила к гибели почти 80% гусениц шелкопряда *Bombyx mori* [166]. В тех же условиях исходный штамм бактерии не оказывал влияния на насекомых.

В работе [167] ген *Bt cry11a* из бактерии *Bt* B-5351 был введен в коммерческий штамм *B. subtilis* 26Д с

использованием для этого интегративной плазмиды pDG1662, конъюгированной геном амилазы *B. subtilis*, и показано, что в клетках линии *B. subtilis* 26Д CryChS эффективно накапливалась мРНК гена *Bt cry11a*. Интеграция гена *Bt cry11a* в хромосому бактерии *B. subtilis* 26Д способствовала формированию у линии *B. subtilis* 26Д CryChS инсектицидной (афицидной) активности, сравнимой с таковой у клеток донорного штамма *Bt* B-5351. Внедрение в эндофитный штамм *B. subtilis* 26Д гена *Bt cry11a*, кодирующего белок Cry1, не приводило к потере эндофитности у рекомбинантного штамма [167, 168]. Аналогичный результат был получен ранее при обработке растений Vt-кукурузы эндофитной бактерией *B. subtilis* B916-gfp [89]. Описанные факты подтверждаются работой Биццари и Бишоп [26], в которой с использованием дефицитных по синтезу кристаллического белка линий *Bt* не обнаружили его существенной роли в эндофитности штаммов. Можно полагать, что продукция инсектицидных белков Cry как самими бактериями, так и Vt-культурами не влияла на свойства эндофитности первых и способность к заселению вторых микроорганизмами.

В качестве дополнения к генно-модифицированным растениям и рекомбинантным бактериям активно развивается направление применения препаратов для защиты растений от вредителей с использованием механизмов РНК-интерференции, в том числе и на основе бактерии *Bt* [169]. Полагают, что с ростом случаев резистентности насекомых к препаратам на основе действующего начала *Bt* использование бактерии в качестве платформы для экспрессии дцРНК может помочь в борьбе с вредителями с помощью стратегии *Bt* + RNAi [170].

Платформа для производства дцРНК на основе *Bt* имеет некоторые преимущества по сравнению с другими платформами. Промотор гена *Cry*, зависящего от споруляции, использовался для экспрессии двуцепочечных РНК, и эта дцРНК могла продуцироваться во время фазы споруляции *Bt*. Более того, другие виды микроорганизмов (такие как *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*) требуют индуктора (IPTG или других) для экспрессии дцРНК, тогда как при использовании *Bt* индуктор не требуется. Наконец, клетки *Bt* могут подвергаться автолизу ферментами после споруляции, поэтому лизис клеток не требуется для извлечения дцРНК [171]. Например, использование *Bt* в качестве экспрессирующего хозяина для производства дцРНК было предложено в работе [171]. Другая группа исследователей [172] создала рекомбинантную линию *Bt*, содержащую экспрессионно-активный фрагмент ДНК длиной 325 п.н. консервативной области гена аргининкиназы капустной моли *P. xylostella*, который проявил высокую инсектицидную активность в отношении личинок целевого вредителя в сравнении с исходным штаммом. Во всех случаях дцРНК экспрессиро-

валась с использованием конвергентных промоторов, окружающих целевую дцРНК. При этом Парк с соавт. [171] использовали промотор *cut1Aa*, а Цзян с соавт. [172] – *Pго3a*.

Значительно усиливалась целевая активность против личинок *Spodoptera littoralis* возраста 4 и 5 в результате получения композиции биопестицида на основе *Bt* (“ХепТари”, Бельгия) при комбинированном использовании dsRNA-Вас, нацеленных против гена *Sl 102*, отвечающего за агрегацию клеток насекомого и инкапсуляцию для защиты от инфекции. Точно также, эффективность биопрепаратов на основе живых бактерий *Bt* усиливалась при применении совместно с dsRNA-Вас, нацеленных против гена *Pxfused P. xylostella* [170], формирующего резистентность насекомых к токсину *Cry1Ac*. Такое совместное использование традиционных методов обработки растений биопрепаратами на основе *Bt* и технологии РНК-интерференции открывает новые горизонты для успешной защиты сельскохозяйственных культур от вредителей и патогенов.

Таким образом, перенос “полезных” генов инсектотоксинов из других хозяйственно значимых видов бактерий *Bt* в эндофитные штаммы, а также конструирование их эффективных консорциумов должно способствовать созданию биопрепаратов нового поколения для комплексной защиты растений и от патогенов, и от вредителей. Способность эндофитных бактерий продуцировать фунги- и инсектотоксичные белки, праймировать фитоиммунные реакции и долговременно существовать в тканях растений будет способствовать отказу от использования трансгенных растений, продуцирующих соответствующие белки.

Итак, данные научной литературы свидетельствуют о том, что в природе существуют эндофитные формы энтомопатогенных микроорганизмов. Такое их природное свойство может способствовать поиску штаммов с комплексной защитной активностью, а также открывает перспективы к генно-инженерному усовершенствованию имеющихся эндофитов для использования их в растениеводстве, например, для обработки семян, что может быть недорогим и надежным способом повышения устойчивости растений к вредителям и болезням. При этом разнонаправленное воздействие бактерий *Bt* на растения повышает эффективность использования указанного метода. Как следует из указанных выше работ, некоторые штаммы могут значительно усилить активность формирования клубеньков азотфиксирующих бактерий. Подавление роста грибов благодаря синтезу *Bt* антибиотиков, хитиназ и других белков способствует приобретению этими бактериями дополнительных свойств биофунгицидов и фунги-

статиков. В то же время необходимо оценивать и возможность подавления этими эндофитными бактериями роста микоризных грибов. Бесспорно, практически ценным свойством эндофитных *Bt* является также способность синтезировать фитогормоны – стимуляторы роста растений, ограничивать синтез этилена и усиливать рост сельскохозяйственных культур в неблагоприятных условиях среды. Еще одним ценным свойством является синтез сидерофоров и возможность мобилизовать в почве труднорастворимые элементы питания растений. Однако наряду со всеми указанными и другими значимыми для защиты и увеличения продуктивности растений свойствами особенно важным является взаимная мутуалистическая интеграция с растением-хозяином, основанная на эндофитности без потери других хозяйственно-полезных качеств.

Механизмы и пути проникновения эндофитов, на наш взгляд, могут быть различными, в том числе и не зависимыми от каких-либо повреждений поверхностных растительных тканей, а также через устьица. Однажды заселившись в растительные ткани инсектицидные *Bt*-эндофиты могут избежать конкуренции со стороны других эпифитных микроорганизмов, иметь доступ к источникам питания в виде растительных метаболитов и веществ, поступающих в растения по сосудам, быть защищенными от действия солнечного излучения, при этом, попадая в кишечник насекомого с частичками растительной пищи, снижать привлекательность растительных тканей как источника питания и даже приводить к гибели фитофага. Конечно, такие инсектицидные эндофиты интересны лишь в том случае, если они не представляют опасность для человека и животных.

Применение эндофитных *Bt* в виде так называемой инсектицидной “мины” замедленного действия, поступающей внутрь насекомых вместе с растительной пищей, привлекает внимание не только для защиты растений от фитофагов, но и с позиции возможности приобретения растениями дополнительных полезных свойств. Например, их использование может позволить с большим успехом бороться с группой вредителей с колюще-сосущим ротовым аппаратом или паразитирующих во внутренних тканях растений, против которых несистемные ХСЗР, а также биопрепараты на основе коммерческих неэндофитных штаммов *Bt* не эффективны.

Использование эндофитных штаммов *Bt* может быть применено для создания совершенно иной стратегии защиты растений, где они могут служить природными инсектицидами длительного сохранения в тканях растений, что, с одной стороны, может способствовать уменьшению кратности обработок биопестицидами, а с другой – расширять диапазон действия не только против вредителей, но и против патогенов. Возможность и

эффективность биоконтроля трансформированными эндофитными штаммами с редактированными генами, также и модифицированными целевыми генами эндофитных *Bt* растений исследованы в меньшей степени, по сравнению с использованием природных, но отселектированных штаммов бактерий. Оценка возможности использования эндофитной микрофлоры в целом, независимо от вида микроорганизма, естественного или же “сконструированного” пока еще находится на самых ранних стадиях. Не исследованы негативные для окружающей среды и человека побочные эффекты, которые могут проявляться при применении препаратов на основе модифицированных или редактированных эндофитов, в том числе *Bt*. Универсальный растительный метабиом, защищающий растения от патогенов и вредителей, может быть удобным при возделывании культур в условиях гидропоники, где исключен контакт растений с почвенным микробиомом. Следует отметить, что в мире беспочвенное гидропонное земледелие становится все более популярным, устраняя проблемы, связанные с загрязнением почв и другими негативными последствиями традиционного земледелия. Как свидетельствуют данные литературы, мировой рынок гидропонных систем оценивался в 2020 г. в пределах 9.5 млрд и, по прогнозам, к 2025 г. достигнет 16.6 млрд долларов, увеличиваясь на 11.9% каждые 5 лет [173].

В настоящее время активно развиваются технологии защиты растений, основанные на РНК-интерференции. Несмотря на очевидные преимущества РНК-препаратов и/или внедрение в геном растений генов, кодирующих смертоносные для насекомых молекулы малых РНК, привлекает к себе внимание комбинированное использование искусственных (в виде спреев препаратов дцРНК) и природных механизмов регулирования численности популяции вредителей с помощью естественных “контролеров”, в качестве которых перспективными являются эндофитные бактерии *Bt*. В аспекте указанного выше природного явления РНК-интерференции использование *Bt* в качестве системы экспрессии биоконтроля дцРНК находится пока в зачаточном состоянии по сравнению с другими хорошо зарекомендовавшими себя технологиями, и требует дальнейших исследований возможности его применения для защиты растений от вредных насекомых, так как в обозримом будущем появятся активные генно-инженерные микроорганизмы для генерации целевых дцРНК и недорогие очищенные препараты этих молекул, что приведет к более экологичному сельскому хозяйству без химических пестицидов.

Работа выполнена по теме государственного задания № АААА-А16-116020350027-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ishiwata S.* // Rept Assoc Seric. 1905. V. 160. P. 1–8.
2. *Berliner E.* // J. Applied Entomology. 1915. V. 2. № 1. P. 29–56.
3. *Lord J.C.* // J. Invertebrate Pathol. 2005. V. 89. № 1. P. 19–29.
4. *Долженко Т.В.* // Биология растений и садоводство: теория, инновации. 2021. № 3(160). С. 50–62.
5. *Peterson J.A., Ode P.J., Oliveira-Hofman C., Harwood J.D.* // Front. Plant Science. 2016. V. 7. Art. 1794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01794>
6. *Шеина Н.И., Буданова Е.В., Мялина Л.И., Сазонова Л.П., Колесникова В.В.* // Токсикологический вестник. 2018. № 1(148). С. 35–37.
7. *Priščepa L., Stankevičienė A., Sneškienė V.* // Miestų želdynų formavimas. 2016. № 1(13). P. 315–322.
8. *Lecadet M.-M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P. et al.* // J. Applied Microbiol. 1999. V. 86. P. 660–672.
9. *Atsumi S., Mizuno E., Hara H., Nakanishi K., Kitami M., Miura N. et al.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 7. P. 3966–3977.
10. *Flores A., Diaz-Zamora J.T., Orozco-Mosqueda M.D.C., Chávez A., de Los Santos-Villalobos S., Valencia-Cantero E. et al.* // Biotech. 2020. V. 10. № 5. Art. 220. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02209-1>
11. *Liu Y., Du J., Lai Q., Zeng R., Ye D., Xu J., Shao Z.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. № 8. P. 2499–2508.
12. *Carroll L.M., Cheng R.A., Wiedmann M., Kovac J.* // Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 2022. V. 62. № 28. P. 7677–7702.
13. *Muigg V., Cuénod A., Purushothaman S., Siegemund M., Wittwer M., Pflüger V., Schmidt K.M.* // New Microbes. New Infect. 2022. V. 26. P. 49–50.
14. *Wei S., Chelliah R., Park B.-J., Kim S.-H., Forghani F., Cho M.S. et al.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. Art. 883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00883>
15. *Schoch C.L., Ciuffo S., Domrachev M., Hotton C.L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D.* // Database (Oxford). 2020. V. 2020. Art. baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
16. *Rahman M.-M., Lim S.-J., Park Y.-C.* // Animals. 2022. V. 12. Art. 979.
17. *Martin P.A.W., Travers R.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. P. 2437–2442.
18. *Elliot S.L., Sabelis M.W., Janssen A., van der Geest L.P.S., Beerling E.A.M. et al.* // Ecology Letters. 2000. V. 3. P. 228–235.
19. *Raymond B., Elliot S.L., Ellis R.J.* // J. Invertebrate Pathol. 2008. V. 98. P. 307–313.
20. *Li M., Shu C., Ke W., Li X., Yu Y., Guan X., Huang T.* // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 676146.
21. *Lin Y., Alstrup M., Pang J.K.Y., Maróti G., Er-Rafik M., Tourasse N. et al.* // mSystems. 2021. V. 6. № 5. Art. e0086421. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00864-21>

22. Smith R.A., Barry J.W. // J. Invertebr. Pathol. 1998. V. 71. № 3. P. 263–267.
23. Bizzarri M.F., Bishop A.H. // J. Invertebr. Pathol. 2007. V. 94. № 1. P. 38–47.
24. Perez K.J., Viana J.d.S., Lopes F.C., Pereira J.Q., dos Santos D.M., Oliveira J.S. et al. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 61. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00061>
25. Takahashi H., Nakaho K., Ishihara T., Ando S., Wada T., Kanayama Y. et al. // Plant Cell Rep. 2014. V. 33. P. 99–110.
26. Bizzarri M.F., Bishop A.H. // Microb. Ecol. 2008. V. 56. № 1. P. 133–139.
27. Monnerat R.G., Soares C.M., Capdeville G., Jones G., Martins É.S., Praça L. et al. // Microb. Biotechnol. 2009. V. 2. № 4. P. 512–520.
28. Mundt J.O., Hinkle N.F. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 32. № 5. P. 694–698.
29. Subrahmanyam P., Reddy M.N., Rao A.S. // Seed Sci. Technol. 1983. V. 11. P. 267–272.
30. McInroy J.A., Kloepper J.W. // Plant and Soil. 1995. V. 173. P. 337–342.
31. Miguel P.S.B., Delvaux J.C., De Oliveira M.N.V., Monteiro L.C.P., Costa M.D., Totola M.R. et al. // Afr. J. Microbiol. Res. 2013. V. 7. № 7. P. 586–594.
32. Ma L., Cao Y.H., Cheng M.H., Huang Y., Mo M.H., Wang Y. et al. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2013. V. 103. № 2. P. 299–312.
33. Souza A., Cruz J.C., Sousa N.R., Procópio A.R., Silva G.F. // Genet. Mol. Res. 2014. V. 13. № 4. P. 8661–8670.
34. Hong Z., Chen W., Rong X., Cai P., Tan W., Huang Q. // Chem. Geol. 2015. V. 416. P. 19–27.
35. Hernández-Pacheco C.E., Orozco-Mosqueda M.D.C., Flores A., Valencia-Cantero E., Santoyo G. // Curr. Res. Microb. Sci. 2021. V. 2. Art. 100028.
36. Sharma M., Mallubhotla S. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. Art. 879386. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879386>
37. Manjunatha B.S., Paul S., Aggarwal C., Bandeppa S., Govindasamy V., Dukare A.S. et al. // Microb. Ecol. 2019. V. 77. P. 676–688.
38. Rocha F.Y.O., Negrissoli Júnior A.S., de Matos G.F., Githay P.M., Rossi C.N., Vidal M.S. et al. // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 659965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659965>
39. Pal G., Kumar K., Verma A., Verma S.K. // Microbiol. Res. 2022. V. 255. Art. 126926. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127201>
40. Abedinzadeh M., Etesami H., Alikhani H.A. // Biotechnol. Rep. (Amst). 2019. V. 21. Art. e00305. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00305>
41. Compant S., Mitter B., Colli-Mull J.G., Gangl H., Sessitsch A. // Microb. Ecol. 2011. V. 62. P. 188–197.
42. Wahlang B., Sen S., Roy J.D. // Indian J. Appl. Pure Bio. 2022. V. 37. № 2. P. 438–448.
43. Tao A., Panga F., Huang S., Yu G., Li B., Wang T. // Biocontrol Science and Technology. 2014. V. 24. P. 901–924.
44. Seo D.J., Nguyen D.M., Song Y.S., Jung W.J. // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 22. № 3. P. 407–415.
45. Pleban S., Ingel F., Che I. // European J. Plant Pathol. 1995. V. 101. P. 665–672.
46. Thomas P., Shaik S.P. // Microb. Ecol. 2020. V. 79. № 4. P. 910–924.
47. García-Suárez R., Verduzco-Rosas L.A., Ibarra J.E. // FEMS Microbiol. Ecol. 2021. V. 97. № 7. Art. fiab080. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab080>
48. Praça L.B., Menezes Mendes Gomes A.C., Cabral G., Martins É.S., Sujii E.R., Monnerat R.G. // Bt Research. 2012. V. 3. № 3. P. 11–19.
49. Каменек Л.К., Сатарова Т.А., Каменек Д.В., Терпуловский М.А. // Сельскохозяйственная биол. 2011. № 1. С. 112–117.
50. Mirsam H., Suriani A.M., Azrai M., Efendi R., Muliadi A., Sembiring H. et al. // Heliyon. 2022. V. 8. № 12. Art. e11960. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11960>
51. Goryluk L.A., Rekosz-Burlaga H., Błaszczuk M. // Polish J. Microbiol. 2009. V. 58. № 4. P. 355–361.
52. Etesami H., Alikhani H.A. // Eur. J. Plant Pathol. 2017. V. 147. P. 7–14.
53. Гришечкина С.Д. // Сельскохозяйственная биол. 2015. Т. 50. № 5. С. 685–693.
54. Glassner H., Zchori-Fein E., Compant S., Sessitsch A., Katzir N., Portnoy V. et al. // FEMS Microbiol. Ecol. 2015. V. 91. № 7. Art. fiv074. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv074>
55. Ouhaibi-Ben Abdeljalil N., Renault D., Gerbore J., Valance J., Rey P., Daami-Remad M. // J. Microb. Biochem. Technol. 2016. V. 8. P. 110–119.
56. Zhou H., Ren Z.H., Zu X., Yu X.Y., Zhu H.J., Li X.J. et al. // Front. Microbiol. 2021. V. 12. Art. 684888. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684888>
57. Nisa S., Shoukat M., Bibi Y., Al Ayoubi S., Shah W., Masood S. et al. // Saudi J. Biol. Sci. 2022. V. 29. № 1. P. 287–295.
58. Vinayarani G., Prakash H.S. // Plant Pathol. J. 2018. V. 34. № 3. P. 218–235. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2017.0225>
59. Kim P.I., Bai H., Chae H., Ching S., Kim Y., Park R. et al. // J. Appl. Microbiol. 2004. V. 97. P. 942–949.
60. Kamenyok L.K., Levina T.A., Teriokhin D.A., Minacheva L.D. // Biotechnology in Russia. 2005. № 1. P. 81–93.
61. Islam M.N., Ali M.S., Choi S.J., Hyun J.W., Baek K.H. // Plant Pathol. J. 2019. V. 35. № 5. P. 486–497.
62. Roy S., Yasmin S., Ghosh S., Bhattacharya S., Banerjee D. // Microbiol. Insights. 2016. V. 9. P. 1–7.
63. Lopes R.B.M., Costa L.E.O., Vanetti M.C.D., Araujo E.F., Queiroz M.V. // Curr. Microbiol. 2015. V. 71. P. 509–516.
64. Anandan K., Vittal R.R. // Microb. Pathog. 2019. V. 132. P. 230–242.
65. Hollensteiner J., Wemheuer F., Harting R., Kolarzyk A.M., Diaz Valerio S.M., Poehlein A. et al. // Front. Microbiol. 2017. V. 7. Art. 2171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02171>
66. Fatima R., Mahmood T., Moosa A., Aslam M.N., Sha-keel M.T., Maqsood A. et al. // Pest Manag. Sci. 2023. V. 79. № 1. P. 336–348.
67. Adeleke B.S., Ayangbenro A.S., Babalola O.O. // Plants (Basel). 2021. V. 10. № 9. Art. 1776.

68. Mercado V., Olmos J. // Probiotics & Antimicro. Prot. 2022. V. 14. P. 1151–1169.
69. Favret M.E., Youston A.A. // J. Invert. Pathol. 1989. V. 53. P. 206–216.
70. Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabous A. // Microbiol Res. 2008. V. 163. № 6. P. 684–692.
71. Paik H.D., Bae S.S., Park S.H., Pan J.G. // J. Industrial Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 19. P. 294–298.
72. Nazari M., Smith D.L. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Art. 916.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00916>
73. Lyu D., Backer R., Subramanian S., Smith D.L. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. Art. 634.
74. Martínez-Zavala S.A., Barboza-Pérez U.E., Hernández-Guzmán G., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E. // Front. Microbiol. 2020. V. 10. Art. 3032.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03032>
75. Aktuganov G.E., Safina V.R., Galimzianova N.F., Gilvanova E.A., Kuzmina L.Yu., Melentiev A.I. et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2022. V. 38. Art. 167.
<https://doi.org/10.1007/s11274-022-03359-5>
76. Muhammad A., Nisa R.M., Aris T.W. // Research J. Microbiol. 2014. V. 9. P. 265–277.
77. Achari G.A., Ramesh R. // PNAS USA. India Sect. B Boil. Sci. 2018. V. 89. P. 585–593.
78. Tanuja R., Bisht S.C., Mishra P.K. // European J. Soil Biol. 2013. V. 56. P. 56–64.
79. Mishra P.K., Bisht S.C., Ruwari P., Subbanna A.R.N.S., Bisht J.K., Bhatt J.Ch. et al. // Ann. Microbiol. 2017. V. 67. P. 143–155.
80. Bai Y., Zhou X., Smith D.L. // Crop Science. 2003. V. 43. № 5. Art. 1774.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1774>
81. Selvakumar G., Kundu S., Gupta A.D., Shouche Y.S., Gupta H.S. // Curr. Microbiol. 2008. V. 56. P. 134–139.
82. Laranjeira S.S., Alves I.G., Marques G. // Curr. Microbiol. 2022. V. 79. № 9. Art. 277.
<https://doi.org/10.1007/s00284-022-02942-1>
83. Li Y., Wang C., Ge L., Hu C., Wu G., Sun Y., Song L. et al. // Plants (Basel). 2022. V. 11. № 9. Art. 1212.
<https://doi.org/10.1007/s00284-022-02942-1>
84. Yung W.J., Mabood F., Souleimanov A., Park R.D., Smith D.L. // Microbiol. Res. 2008. V. 163. № 3. P. 345–349.
85. Djenane Z., Nateche F., Amziane M., Gomis-Cebolla J., El-Aichar F., Khorf H. et al. // Toxins (Basel). 2017. V. 9. № 4. Art. 139.
<https://doi.org/10.3390/toxins9040139>
86. Belousova M.E., Malovichko Y.V., Shikov A.E., Nizhnikov A.A., Antonets K.S. // Toxins (Basel). 2021. V. 13. № 5. Art. 355.
<https://doi.org/10.3390/toxins13050355>
87. Wang X., Xue Y., Han M., Bu Y., Liu C. // Chemosphere. 2014. V. 108. P. 258–264.
88. Chen Y., Pan L., Ren M., Li J., Guan X., Tao J. // GM Crops Food. 2022. V. 13. № 1. P. 1–14.
89. Sun C., Geng L., Wang M., Shao G., Liu Y., Shu C. et al. // Microbiology open. 2017. V. 6. № 1. Art. e00404.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.02.005>
90. Yang S., Liu X., Xu X., Sun H., Li F., Hao C. et al. // Plants (Basel). 2022. V. 11. № 17. Art. 2218.
<https://doi.org/10.3390/plants11172218>
91. Kirtel O., Versluys M., Van den Ende W., Öner E.T. // Quorum Sensing. Molecular Mechanism and Biotechnological Application. 2019. / Ed. G. Tommonaro. Chap: Academic Press, 2019. P. 127–149.
92. Park S.J., Park S.Y., Ryu C.M., Park S.H., Lee J.K. // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 9. P. 1518–1521.
93. Cho H.S., Park S.Y., Ryu C.M., Kim J.F., Kim J.G., Park S.H. // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 60. P. 14–23.
94. Kumar A., Singh R., Yadav A., Giri D.D., Singh P.K., Pandey K.D. // Biotech. 2016. V. 6. № 1. Art. 60.
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0393-y>
95. Batista B.D., Dourado M.N., Figueredo E.F., Hortencio R.O., Marques J.P.R., Piotto F.A. et al. // Arch. Microbiol. 2021. V. 203. № 7. P. 3869–3882.
96. Armada E., Probanza A., Roldán A., Azcón R. // J. Plant Physiol. 2016. V. 192. P. 1–12.
97. Ali M.M., Vora D. // Int. Res. J. Envir. Sci. 2014. V. 3. № 9. P. 27–31.
98. Ismail M.A., Amin M.A., Eid A.M., Hassan S.E., Mahgoub H.A.M., Lashin I. et al. // Cells. 2021. V. 10. № 5. Art. 1059.
<https://doi.org/10.3390/cells10051059>
99. Vyas P., Kaur R. // J. Soil Sci. Plant Nutr. 2019. V. 19. P. 290–298.
100. Ahumada G.D., Gómez-Álvarez E.M., Dell'Acqua M., Bertani I., Venturi V., Perata P. et al. // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 908349.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.908349>
101. Figueredo E.F., Cruz T.A.D., Almeida J.R., Batista B.D., Marcon J., Andrade P.A.M. et al. // Microbiol. Res. 2023. V. 266. Art. 127218.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127218>
102. Vidal-Quist J.C., Rogers H.J., Mahenthalingam E., Berry C. // FEMS Microbiol. Ecol. 2013. V. 86. P. 474–489.
103. Azizoglu U. // Curr. Microbiol. 2019. V. 76. P. 1379–1385.
104. Sharma N., Saharan B.S. // Microbiol. Res. J. Int. 2016. V. 16. P. 1–10.
105. Dubey A., Saiyam D., Kumar A., Hashem A., Abd Alah E.F., Khan M.L. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2021. V. 18. Art. 931.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18030931>
106. Ali B., Hafeez A., Ahmad S., Javed M.A., Sumaira, Afridi M.S. et al. // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. Art. 921668.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.921668>
107. de Almeida J.R., Bonatelli M.L., Batista B.D., Teixeira-Silva N.S., Mondin M., Dos Santos R.C. et al. // Environ. Microbiol. Rep. 2021. V. 13. № 6. P. 812–821.
108. Chaouachi M., Marzouk T., Jallouli S., Elkahoui S., Gentzbittel L., Ben C. et al. // Postharvest Biol. Technol. 2021. V. 172. Art. 111389.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>
109. Huang C.J., Tsay J.F., Chang S.Y., Yang H.P., Wu W.S., Chen C.Y. // Pest Manag. Sci. 2012. V. 68. № 9.

- Art. 1306–10.
<https://doi.org/10.1002/ps.3301>
110. Timmusk S., Abd El-Daim I.A., Copolovici L., Tanilas T., Kännaste A., Behers L. et al. // PLoS One. 2014. V. 9. № 5. Art. e96086.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
 111. Vardharajula S., Ali S.Z., Grover M., Reddy G., Bandi V. // J. Plant Interactions. 2011. V. 6. № 1. P. 1–14.
 112. Babu A.G., Kim J.-D., Oh B.-T. // J. Hazardous Materials. 2013. V. 250–251. P. 477–483.
 113. Dolphen R., Thiravetyan P. // Chemosphere. 2019. V. 223. P. 448–454.
 114. Akhtar N., Ilyas N., Yasmin H., Sayyed R.Z., Hasnain Z., Elsayed E.A. et al. // Molecules. 2021. V. 26. Art. 1569.
<https://doi.org/10.3390/molecules26061569>
 115. Huang H., Zhao Y., Fan L., Jin Q., Yang G., Xu Z. // Chemosphere. 2020. V. 260. Art. 127614.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127614>
 116. Shah A.A., Bibi F., Hussain I., Yasin N.A., Akram W., Tahir M.S. et al. // Plants (Basel). 2020. V. 9. № 11. Art. 1512.
<https://doi.org/10.3390/plants9111512>
 117. Zheng L.P., Zou T., Ma Y.J., Wang J.W., Zhang Y.Q. // Molecules. 2021. V. 21. № 2. Art. 174.
<https://doi.org/10.3390/molecules21020174>
 118. Autarmat S., Treesubsuntorn C., Thiravetyan P. // Envir. Exp. Botany. 2022. V. 194. Art. 104761.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104761>
 119. Khaksar G., Treesubsuntorn C., Thiravetyan P. // Environ. Exp. Bot. 2016. V. 126. P. 10–20.
 120. Daudzai Z., Treesubsuntorn C., Thiravetyan P. // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. V. 164. P. 50–60.
 121. Suyamud B., Thiravetyan P., Panyapinyopol B., Inthorn D. // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. V. 157. P. 318–326.
 122. Fan J., Yang G., Zhao H., Shi G., Geng Y., Hou T. et al. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2012. V. 58. № 4. P. 263–271.
 123. Sunkar S., Nachiyar C.V. // Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2012. V. 2. № 12. P. 953–959.
 124. Sayed A.M.M., Kim S., Behle R.W. // Biocontrol Sci. and Technol. 2017. V. 27. P. 1308–1326
 125. Khan M.A., Asaf S., Khan A.L., Jan R., Kang S.M., Kim K.M. et al. // BMC Microbiol. 2020. V. 20. Art. 175.
<https://doi.org/10.1186/s12866-020-01822-7>
 126. Araújo R.C., Rodrigues F.A., Nadal M.C., Ribeiro M.S., Antônio C.A.C., Rodrigues V.A. et al. // Microbiol. Res. 2021. V. 248. Art. 126750.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126750>
 127. Damodaran T., Rai R.B., Jha S.K., Kannan R., Pandey B.K., Sah Vijayalaxmi et al. // J. Plant Interactions. 2014. V. 9. № 1. P. 577–584.
 128. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J. et al. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998. V. 62. P. 775–806.
 129. Chakrabarty S., Chakrabarty P., Islam T., Islam A.K.M.A., Datta J., Bhattacharjee T. et al. In: Bacilli and Agrobiotechnology. / Eds. M.T. Islam, M. Rahman, P. Pandey, C.K. Jha, A. Aeron. Cham: Springer, 2022. 397 p.
 130. Crickmore N., Berry C., Panneerselvam S., Mishra R., Connor T.R., Bonning B.C. // J. Invertebr. Pathol. 2020. Art. 107438.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
 131. Palma L., Muñoz D., Berry C., Murillo J., Caballero P. // Toxins (Basel). 2014. V. 6. № 12. P. 3296–3325.
 132. Chattopadhyay P., Banerjee G. // Biotech. 2018. V. 8. № 4. Art. 201.
<https://doi.org/10.1007/s13205-018-1223-1>
 133. Liu X., Ruan L., Peng D., Li L., Sun M., Yu Z. // Toxins. 2014. V. 6. P. 2229–2238.
 134. Soonsanga S., Luxananil P., Promdonkoy B. // Biotechnol. Lett. 2020. V. 42. № 4. P. 625–632.
 135. Hu H.J., Chen Y.L., Wang Y.F., Tang Y.Y., Chen S.L., Yan S.Z. // Plant Disease. 2017. V. 101. № 3. P. 448–455.
 136. Maulidia V., Soesanto L., Syamsuddin, Khairan K., Hamaguchi T., Hasegawa K. et al. // Biodiversitas. 2020. V. 21. P. 5270–5275.
 137. Liang Z., Ali Q., Wang Y., Mu G., Kan X., Ren Y. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 15. Art. 8189.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158189>
 138. Aballay E., Prodan S., Correa P., Allende J. // Crop Protect. 2020. V. 131. Art. 105103.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158189>
 139. Yu Z., Xiong J., Zhou Q., Luo H., Hu S., Xia L. et al. // J. Invertebr. Pathol. 2015. V. 125. P. 73–80.
 140. Huang T., Lin Q., Qian X., Zheng Y., Yao J., Wu H. et al. // Phytopathology. 2018. V. 108. P. 44–51.
 141. Schnepf H.E., Whiteley H.R. // PNAS. USA. 1981. V. 78. № 5. P. 2893–2897.
 142. Peng Q., Yu Q., Song F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. № 4. P. 1617–1626.
 143. Zhou X.Y., Li H., Liu Y.M., Hao J.Ch., Liu H.F., Lu X.Z. // Adsorption Sci. Technol. 2018. V. 36(5–6). P. 1233–1245.
 144. Reinders J.D., Reinders E.E., Robinson E.A., Moar W.J., Price P.A., Head G.P. et al. // PLoS One. 2022. V. 17. № 5. Art. e0268902.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268902>
 145. Maghari B.M., Ardekani A.M. // J. Med. Biotechnol. 2011. V. 3. № 3. P. 109–117.
 146. Jost P., Shurley D., Culpepper S., Roberts P., Nichols R., Reeves J. et al. // Agron. J. 2008. V. 100. № 1. P. 42–51.
 147. Tabashnik B.E., Carrière Y. // J. Econ. Entomol. 2020. V. 113. № 2. P. 553–561.
 148. Ni M., Ma W., Wang X., Gao M., Dai Y., Wei X. et al. // Plant Biotechnol. J. 2017. V. 15. P. 1204–1213.
 149. de Maagd R.A., van der Klei H., Bakker P.L., Stieckema W.J., Bosch D. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 1537–1543.
 150. Pardo-Lopez L., Mudoz-Garay C., Porta H. // Peptides. 2009. V. 30. № 3. P. 589–595.
 151. Wu D., Aronson A.I. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 2311–2327.
 152. Rajamohan F., Alzate O., Cotrill J.A., Curtiss A., Dean D.H. // PNAS. USA. 1996. V. 93. P. 14338–14343.
 153. Jamoussi K., Sellami S., Abdelkefi-Mesrati L., Givaudan A., Jaoua S. // Mol. Biotechnol. 2009. V. 43. № 2. P. 97–103.
 154. Tounsi S., Aoun A.E., Blight M., Rebaï A., Jaoua S. // J. Invertebr. Pathol. 2006. V. 91. № 2. P. 131–135.

155. Yan F., Cheng X., Ding X., Yao T., Chen H., Li W. et al. // Curr. Microbiol. 2014. V. 68. P. 604–609.
156. Sun Y., Fu Z., He X., Yuan C., Ding X., Xia L. // J. Invertebr. Pathol. 2016. V. 135. P. 60–62.
157. Gawron-Burke C., Baum J.A. // Genet. Eng. (N.Y.). 1991. V. 13. P. 237–263.
158. Azizoglu U., Jouzani G.S., Yilmaz N., Baz E., Ozkok D. // Sci. Total Environ. 2020. V. 734. Art. 139169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139169>
159. Wozniak C.A., McClung G., Gagliardi J., Degal M., Matthews K. In: Regulation of Agricultural Biotechnology: The United States and Canada. Chapter 4. Eds. C.A.Wozniak, A. McHughen. US Government. 2012. P. 57.
160. Hernandez-Rodriguez C.S., de Escudero I.R., Asensio A.C., Ferre J., Caballero P. // Biological Control. 2013. V. 66. P. 159–165.
161. Saleem F., Shakoori A.R. // Toxins (Basel). 2017. V. 9. № 11. Art. 358.
162. Roh J.Y., Kim Y.S., Wang Y., Liu Q., Tao X., Xu H.G. et al. // J. Asia-Pacific Entomology. 2010. V. 13. № 1. P. 61–64.
163. Nambiar P.T.C., MaS W., Aiyer V.N. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 2866–2869.
164. Skøt L., Harrison S.P., Nath A., Mytton L.R., Clifford B.C. // Plant and Soil. 1990. V. 127. P. 285–295.
165. Obukowicz M.G., Perlak F.J., Kusano K. K., Mayer E.J., Watrud L.S. // Gene. 1986. V. 45. P. 327–331.
166. Li Y., Wu Ch., Xing Zh., Gao B., Zhang L. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2017. V. 31. № 6. P. 1167–1172.
167. Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A. et al. // Biological Control. 2020. V. 144. Art. 104242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242>
168. Sorokan A., Benkovskaya G., Burkhanova G., Blagova D., Maksimov I. // Plants. 2020. V. 9. Art. 1115. <https://doi.org/10.3390/plants9091115>
169. Price D.R., Gatehouse J.A. // Trends in Biotechnol. 2008. V. 26. № 7. P. 393–400.
170. Gong L., Kang Sh., Zhou J., Sun D., Guo L., Qin J. et al. // Toxins (Basel). 2020. V. 12(2). P. 76. <https://doi.org/10.3390/toxins12020076>
171. Park M.G., Kim W.J., Choi J.Y., Kim J.H., Park D.H., Kim J.Y. et al. // Pest Manag. Sci. 2020. V. 76. P. 1699–1704.
172. Jiang Y.X., Chen J.Z., Li M.W., Zha B.H., Huang P.R., Chu X.M. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 23. № 1. Art. 444. <https://doi.org/10.3390/ijms23010444>
173. Azizoglu U., Yilmaz N., Simsek O., Ibal J.C., Tägele S.B., Shin J.-H. // Biotech. 2021. V. 11. Art. 382. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02941-2>

The Perspective Properties and the Directions of *Bacillus thuringiensis* Use for Plant Protection

R. M. Khairullin^a*, A. V. Sorokan^a, V. F. Gabdrakhmanova^a, and I. V. Maksimov^a

^aInstitute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Center
of Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: krm62@mail.ru

One of the urgent problems of plant protection from pests and diseases is the creation of environmentally safe biocontrol agents, the use of which would not be accompanied by an increase of the resistance of insect pests. Microorganisms have great potential in this regard. The most promising group are endophytes, which inhabit the internal tissues of plants and participate in formation of the phenotype of plant organisms. Bacteria of the genus *Bacillus* are of particular interest due to their wide distribution in the nature, the safety of many species for humans, and the relative ease with which biocontrol means based on *Bacillus* sp. could be obtained. The review considers the properties and activity of *B. thuringiensis* as follows: endophytic, insecticidal, antibiotic activity, production of growth regulators and mobilization of plant nutrients, resistance induction, as well as the possibility of constructing new strains using genetic engineering methods.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, endophytes, biological activity

УДК 620.193.81

КОРРОЗИОННАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБРАСТАНИЙ КОНСТРУКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ В ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЕ БАРЕНЦЕВА МОРЯ

© 2023 г. Д. Ю. Власов^{1, 6, *}, А. Л. Брюханов², Г. Г. Няникова³,
М. С. Зеленская¹, И. М. Царовцева⁴, А. Р. Изатулина⁵

¹Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет,
Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

³Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
факультет химической и биотехнологии, Санкт-Петербург, 190013 Россия

⁴АО Всероссийский научно-исследовательский институт гидротехники
им. Б.Е. Веденеева, Санкт-Петербург, 195220, Россия

⁵Санкт-Петербургский государственный университет,
Институт наук о Земле, Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁶Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2023 г.

После доработки 26.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Исследованы потенциально коррозионно-активные микроорганизмы, выделенные с конструкционных материалов с признаками биообрастаний на побережье Кислой губы (Баренцево море, Россия): сульфатредуцирующие, железоокисляющие и сероокисляющие бактерии. По результатам определения нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК идентифицированы культуры сульфатредуцирующих бактерий (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.), сероокисляющих бактерий (*Dietzia* sp.) и железоокисляющих бактерий (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp.). Методами сканирующей электронной микроскопии, энергодисперсионного микроанализа химического состава и рентгенофазового анализа выявлены значительные изменения структуры и химического состава поверхностного слоя образцов стальной арматуры, экспонированных в течение 28 сут в присутствии выделенных культур микроорганизмов, что свидетельствовало об их активном участии в биокоррозионных процессах. Показано, что образование аналогов минералов в продуктах коррозии зависит от штаммов указанных бактерий и, очевидно, связано с особенностями их метаболизма. Наибольшую активность в развитии коррозионных процессов проявили сульфатредуцирующие бактерии, выделенные из литоральной зоны Баренцева моря.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), сероокисляющие бактерии, железобактерии, Баренцево море, конструкционные материалы, биокоррозия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), рентгенофазовый анализ (РФА)

DOI: 10.31857/S0555109923040189, **EDN:** QZTZAQ

Коррозионное разрушение различных строительных и конструкционных материалов может быть вызвано не только воздействием физико-химических факторов внешней среды, такими, как перепады температуры, атмосферные осадки, повышенная влажность, ветровая эрозия, изменения рН и концентрации кислорода, реакции с химически активными соединениями, но и развитием микроорганизмов. Биокоррозии подвержены практически все материалы, в том числе бетон, кирпич, металлы и их сплавы, древесина и

даже полимеры [1–4]. Особенно подвержены биокоррозии гидротехнические и портовые сооружения, что приводит к снижению их прочности и долговечности, а также увеличивает расходы на их содержание и ремонт.

Существенный вклад в повреждения металлических и железобетонных конструкций вносят микроорганизмы, которые проникают в их толщу, а также размножаются на поверхности материалов, формируя биопленки и обрастания. Нали-

чие биопленок непосредственно на поверхности материала приводит к резкому изменению физико-химических параметров приграничного слоя относительно водной фазы, что оказывает значительное влияние на кинетику коррозионных процессов [5–9]. Биологические, физические и химические процессы, приводящие к коррозии, очень тесно взаимосвязаны.

В целом, механизмы повреждения конструкционных материалов микроорганизмами можно разделить на два типа: биофизические (механическое разрушение в результате развития микроорганизмов непосредственно в материале) и биохимические (воздействие метаболитов, выделяемых клетками микроорганизмов, и использование самого материала в качестве источника получения энергии или химических элементов для роста и развития микроорганизмов) [10, 11].

Биохимическое воздействие микроорганизмов на конструкционные материалы, в свою очередь, может происходить различными путями [2, 3, 10–12]: 1) путем непосредственного воздействия химически активных и реакционноспособных продуктов метаболизма микроорганизмов (H_2S , NH_3 , CO_2 , органические и неорганические кислоты и т.д.) на металлы, бетоны и др.; 2) через образование органических продуктов, которые могут действовать как деполяризаторы гальванической коррозии или катализаторы химических реакций, приводящих к коррозии; 3) через коррозионные реакции, являющиеся отдельной частью метаболического цикла микроорганизмов.

Ключевыми группами микроорганизмов – агентов биокоррозии являются сульфатредуцирующие, железо- и марганец-окисляющие, сероокисляющие, нитрифицирующие и аммонифицирующие бактерии, а также микромицеты. Они особенно активны в морских экосистемах, где создаются благоприятные условия для формирования и жизнедеятельности микробных сообществ, и потому скорость биокоррозионных процессов достаточно высока [13]. В микроразделах поверхностного слоя материалов, а именно, в трещинах, порах, углублениях и кавернах происходит адсорбция клеток микроорганизмов. На поверхности материалов образуются биопленки, которые способствуют прикреплению клеток к субстрату. Под биопленками могут создаваться анаэробные условия, оптимальные для развития коррозионно-активных сульфатредуцирующих бактерий [14, 15]. Как сами микробные клетки, использующие компоненты материалов в качестве источника энергии, донора или акцептора электронов, так и внеклеточные метаболиты микроорганизмов (неорганические и органические кислоты, гликаны, сероводород, аммиак и другие) оказывают серьезное воздействие на конструкционные материалы. Это приводит к изменению не только визуальных при-

знаков проявления биоповреждений (обрастание поверхности мицелием грибов или колониями бактерий, появление каверн и трещин), но и к изменению физико-механических свойств, потере прочности и других практически важных свойств материалов [8].

Аэробную коррозию стальных и бетонных конструкций, то есть идущую в присутствии достаточного количества кислорода, осуществляют, в основном, сероокисляющие, нитрифицирующие и железобактерии [2, 5]. В результате жизнедеятельности сероокисляющих и нитрифицирующих бактерий в окружающей среде в качестве агрессивных конечных продуктов их метаболизма накапливаются, соответственно, серная и азотная кислоты.

Сероокисляющие бактерии, играющие ключевую роль в окислении неорганических восстановленных соединений серы (элементарная сера, сульфид, тиосульфат, сульфит, тритионат, тетратионат) и выщелачивании металлов, широко распространены в морских и пресных водоемах, почвах, а также в разрушающихся горных породах. Они являются хемолитотрофами, среди них встречаются и термофилы, обитающие в термальных водных источниках вулканического происхождения. Известно, что скорость бактериального окисления дисульфида железа (пирита) в кислой среде многократно выше скорости его химического окисления [16, 17]. В процессе бактериального окисления пирита протекает несколько химических реакций, в результате которых образуется серная кислота и резко снижается pH среды (вплоть до 1.0): $FeS_2 + 3.5O_2 + H_2O \rightarrow FeSO_4 + H_2SO_4$; $2FeSO_4 + 0.5O_2 + H_2SO_4 \rightarrow Fe_2(SO_4)_3 + H_2O$; $FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow 3FeSO_4 + 2S^0$; $S^0 + H_2O + 1.5O_2 \rightarrow H_2SO_4$. Необходимо отметить, что роль сероокисляющих бактерий в биокоррозионных процессах сводится не только к образованию серной кислоты. Например, *Acidithiobacillus ferrooxidans* окисляет сульфат железа(II) до сульфата железа(III), являющегося чрезвычайно агрессивным по отношению к металлическим конструкциям окислителем. Принимая электроны с поверхности железа или стали, сульфат железа(III) восстанавливается до сульфата железа(II), которое снова окисляется клетками *A. ferrooxidans*. В условиях, благоприятных для развития сероокисляющих бактерий, этот процесс может идти постоянно, из-за чего существует угроза быстрого разрушения металла [18].

Образование агрессивной для металлов кислоты происходит также и в результате жизнедеятельности хемолитоавтотрофных нитрифицирующих бактерий, обитающих в почве и природных водах [19]. Процесс нитрификации приводит к образованию азотной кислоты за счет двухстадийного процесса окисления аммиака, связанного с получением энергии: $NH_3 + 1.5O_2 \rightarrow HNO_2 + H_2O$;

$\text{HNO}_2 + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{HNO}_3$. Первую стадию нитрификации осуществляют нитрозобактерии родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* и *Nitrosospira*, а вторую стадию нитрификации обеспечивают нитробактерии родов *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* и *Nitrospina*.

Железобактерии очень широко распространены в природе, в том числе в пресных и морских водоемах, и играют большую роль в круговороте железа, образуя отложенные руды железа на дне болот и морей. Эти аэробные микроорганизмы являются хемотрофами, способными окислять двухвалентное железо (Fe^{2+}) до трехвалентного (Fe^{3+}) в реакции $4\text{Fe}(\text{HCO}_3)_2 + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{Fe}(\text{OH})_3 + 8\text{CO}_2$, используя освобождающуюся энергию на усвоение углерода из углекислого газа или карбонатов. Участие железобактерий в коррозионных процессах связывают, преимущественно, с формированием дифференцированно аэрируемых ячеек на поверхности корродируемого материала [20–22]. Сущность этого процесса состоит в следующем – железобактерии прочно закрепляются на поверхности металла, образуя слизистые скопления. Участки металлоконструкций, не подвергшиеся колонизации железобактериями, аэрируются хорошо, но участки, покрытые минерализованными охристыми отложениями за счет метаболизма железобактерий, подвергаются воздействию кислорода в меньшей степени. Соответственно, аэрируемые участки поверхности имеют более высокий потенциал и выполняют роль катода, тогда как менее аэрируемые участки функционируют как анод. В анодной зоне железо растворяется и начинается процесс коррозии. Кроме того, железобактерии могут синтезировать пероксид водорода, являющийся сильным окислителем и активным коррозионным агентом [20].

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ) – облигатно анаэробные микроорганизмы. Основным конечным акцептором электронов для клеток СРБ является сульфат, который восстанавливается до сероводорода в процессе диссимиляционной сульфатредукции (сульфатного дыхания). Многие сульфатредукторы могут восстанавливать также сульфиты, тиосульфаты и, реже, молекулярную серу. Донорами электронов служат преимущественно низкомолекулярные органические соединения, которые образуются при анаэробном разложении биомассы, а также молекулярный водород ($4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$) [23].

Сульфатредуцирующие микроорганизмы являются филогенетически неоднородной группой, наибольшее количество родов принадлежит классу *Deltaproteobacteria* типа *Proteobacteria*, также много СРБ обнаружено в типе *Firmicutes*. Существуют по меньшей мере три рода сульфатредуцирующих архей. СРБ, в особенности представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*, очень широко распространены в различных анаэробных экосисте-

мах, например, в морских донных осадках и илах сточных вод, являясь важным звеном в биогеохимическом цикле серы [24].

Механизмы анаэробной коррозии железа, стали и алюминия в присутствии СРБ заключаются как в прямом взаимодействии образуемого ими сероводорода с металлами, так и в катодной деполяризации участков поверхности корродирующего металла за счет потребления СРБ молекулярного водорода в приэлектродном слое и формирования дополнительных гальванических пар неравномерно растущими биопленками и отложениями сульфидов, образующихся в результате взаимодействия ионов металла с сульфид-ионами – конечным продуктом бактериального восстановления сульфатов. Такие процессы часто ведут к стрессовой коррозии за счет растрескивания металла из-за проникновения водорода, образующегося в катодной зоне [25–28].

То есть СРБ используют биопленку, обогащенную сульфидами, как катод, осуществляя катодную деполяризацию с использованием водорода, слой которого в кислой среде защищает металл от коррозии, для последующего восстановления сульфатов. Водород утилизируется клеточными трансмембранными гидрогеназными комплексами, что приводит к ускорению коррозии железа. Коррозионное разрушение за счет этих электрохимических реакций происходит на металле (аноде), и оно идет в десятки раз более интенсивно, чем просто химическая сероводородная коррозия. В целом, масштабы анаэробной коррозии, вызываемой СРБ, огромны, ущерб от нее в мире превышает несколько миллиардов долларов в год [7].

Известны микробиоценозы из железоокисляющих и сульфатредуцирующих бактерий, ускоряющие коррозию стальных труб [29]. Описаны также сообщества из мицелиальных грибов, бактерий рода *Pseudomonas* (представители которого характеризуются чрезвычайной лабильностью метаболизма) и СРБ, корродирующие алюминиевые и стальные конструкции [30, 31].

В связи с вышеизложенным крайне актуальными вопросами являются выявление, идентификация и изучение коррозионно-активных микроорганизмов с целью специфического подбора и разработки эффективных средств для защиты различных конструкционных материалов от микробной коррозии, на долю которой, по некоторым оценкам, приходится свыше 20% от всех коррозионных повреждений [5]. Особый практический интерес представляет изучение процессов биокоррозии различных конструкционных материалов в суровом морском климате арктических широт, где сейчас активно развивается экономическая деятельность. Важными объектами, подвергающимися процессам биоповреждений, являются портовые сооружения, морские суда, платформы

Таблица 1. Образцы конструкционных материалов, размещенных на испытательных стендах в прибрежной зоне Кислой губы (Баренцево море)

Маркировка образца	Описание образца
1А	Бетон. Кубики. Грань 10 см
2А	Дерево. Кубики без защитного покрытия. Грань 10 см
3А	Дерево. Кубики с защитным покрытием*. Грань 10 см
4А	Стальная арматура Ø 10 мм
5А	Стальная арматура Ø 16 мм
6А	Стальная арматура Ø 16 мм с защитным покрытием
7Л	Бетон. Кубики. Грань 10 см.
8Л	Дерево. Кубики без защитного покрытия. Грань 10 см
9Л	Дерево. Кубики с защитным покрытием*. Грань 10 см
10Л	Стальная арматура Ø 10 мм
11Л	Стальная арматура Ø 16 мм
12Л	Стальная арматура Ø 16 мм с защитным покрытием*

Примечание: А – атмосферная зона, Л – литоральная зона

* Защитное покрытие на основе четвертичных аммониевых соединений предложено для испытаний Институтом химии силикатов им. И.В. Гребенщикова РАН.

по добыче полезных ископаемых на шельфе, трубопроводы, гидротехнические сооружения и др.

Цель исследования – изучение коррозионной активности сульфатредуцирующих, сероокисляющих и железоокисляющих бактерий, выделенных в чистые культуры из обрастаний конструкционных материалов, которые были экспонированы на климатических испытательных стендах в прибрежной зоне Баренцева моря в районе Кислой губы (Мурманская область, Россия), в отношении конструкционной стали.

МЕТОДИКА

Исследуемые материалы. Образцы конструкционных материалов (стальная арматура, а также бетон и дерево), применяющихся в гидротехническом строительстве, экспонировали на испытательных стендах в натуральных условиях в литоральной и атмосферной зонах Баренцева моря в районе Кислогубской приливной электростанции (Мурманская область, Россия) с марта по сентябрь 2020 г. Описание образцов представлено в табл. 1. Литоральный стенд с прикрепленными к нему образцами материалов подвергался периодическому затоплению морской водой и осушению, что было связано с приливно-отливными ритмами, а атмосферный стенд с теми же материалами располагался на суше в непосредственной близости к береговой линии. Следует отметить, что прибрежная зона Кислой губы Баренцева моря – интересный и уникальный арктический биотоп, а микробиологические исследования проводились здесь впервые.

Культивирование коррозионно-активных микроорганизмов. Для получения накопительных и чистых культур коррозионно-активных микроорганизмов использовали селективные питательные среды, в которые помещали соскобы образцов соответствующих конструкционных материалов после их снятия с испытательных стендов.

Для органотрофных железоокисляющих бактерий использовали питательную среду Захаровой [32], г/л: $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 5.9; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5; NaNO_3 – 0.5; K_2HPO_4 – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.5; лимонная кислота – 10.0; сахароза – 2.0; триптон – 1.0; pH 6.5–6.8.

Для сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) использовали питательную среду Видделя для морских форм СРБ [33], г/л: Na_2SO_4 – 4.0; KH_2PO_4 – 0.2; NH_4Cl – 0.25; NaCl – 13.5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – 0.4; KCl – 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – 0.1; витамины по Видделю – 1.0 мл; микроэлементы SL-10 – 1.0 мл; 0.2 М фосфатный буферный раствор (pH 7.2) – 1 мл; лактат Na (50%-ный раствор) – 5.0 мл; ацетат Na (2 М) – 10.0 мл; дрожжевой экстракт (5%-ный раствор) – 10.0 мл; NaHCO_3 (10%-ный раствор) – 10.0 мл; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ (5%-ный раствор) – 10.0 мл; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (5%-ный раствор) – 0.5 мл; pH 7.4. Приготовление питательных сред для культивирования СРБ проводили в строго анаэробных условиях в соответствии с модифицированной техникой Хангейта [34]. Кислород из питательных сред удаляли с помощью вакуумной установки дегазации, замещая его инертным газом аргоном.

Для сероокисляющих бактерий использовали питательную среду Бейеринка [35], г/л:

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O} - 5.0$; $\text{NH}_4\text{Cl} - 0.1$; $\text{NaHCO}_3 - 1.0$;
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O} - 0.2$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0.01$; pH 9.2.

Нитрифицирующие бактерии выращивали на питательной среде Виноградского [36], г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2.0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O} - 1.0$; $\text{MgSO}_4 - 0.5$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} - 0.01$; $\text{NaCl} - 2.0$; $\text{CaCO}_3 - 1.0$; pH 7.5.

Для приготовления плотных питательных сред добавляли агар в количестве 2%. Среды стерилизовали в автоклаве при давлении $P_{\text{изб.}} = 5.05 \times 10^4$ Па в течение 30 мин.

Выделение чистых культур осуществляли методом предельных разведений (в диапазоне разведений от 10^{-1} до 10^{-10}) с отбором выросших колоний на агаризованных питательных средах и многократными пересевами. Доминирующая в микробных сообществах прибрежных вод Кислой губы бактерия *Pseudomonas fluorescens* штамм ССМ 2115 была депонирована в Ведомственную коллекцию полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ) под регистрационным номером RCAM05389 как рекомендованная в качестве тест-культуры коррозионно-активных микроорганизмов.

Культивирование анаэробных микроорганизмов проводили в герметично закрытых пробирках Хангейта с жидкой или агаризованной питательной средой, пересевы осуществляли с помощью стерильных шприцев, инкубировали культуры при температуре 23–25°C в темноте в течение 3–25 сут. Рост сульфатредуцирующих бактерий с использованием различных доноров электронов оценивали на жидкой питательной среде Видделя для морских форм СРБ с сульфатом в качестве акцептора электронов, заменяя лактат на исследуемый субстрат. Все используемые субстраты готовили в виде концентрированных растворов и стерилизовали автоклавированием при $P_{\text{изб.}} = 5.05 \times 10^4$ Па в течение 30 мин.

Изучение физиолого-биохимических свойств чистых культур микроорганизмов. Микроскопирование после окрашивания фуксином и по Граму осуществляли с использованием светового микроскопа ЛОМО Микмед-1 (Россия) при увеличении 400× и 900×.

Рост чистых культур СРБ оценивали по увеличению оптической плотности при λ 575 нм, концентрацию сероводорода измеряли колориметрическим методом с N,N-диметил-*n*-фенилендиамином и железозамещенными квасцами [37]. Отношение к кислороду определяли методом укола в столбики соответствующей агаризованной питательной среды. Для определения влияния температуры на рост бактерии культивировали на плотных и в жидких питательных средах в температурном диапазоне 4–57°C. Для изучения влияния pH среды на рост бактерии культивировали в

диапазоне pH 3.5–10.5 с шагом 0.5 при оптимальной для их роста температуре. Для определения галофильности культивирование проводили в пробирках с соответствующей жидкой питательной средой, содержащей NaCl и MgCl_2 , в диапазоне концентраций 0–10% с шагом 0.25%.

Выделение ДНК и идентификация культур микроорганизмов по гену 16S рРНК. Для выделения тотальной ДНК из биомассы микроорганизмов использовали набор Genomic DNA Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), следуя инструкциям производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК для таксономической идентификации выделенных чистых культур проводили в компании “Бигль” (Россия) и в ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big-Dye Terminator v. 3.1 (“Applied Biosystems”, США) на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3730 (“Applied Biosystems”, США). Для секвенирования использовали праймеры 341f и 805r (на V3–V4 регион гена 16S рРНК), а также праймеры 11f и 1492r (на V1–V9 регион гена 16S рРНК), чтение проводили в перекрывающихся направлениях [38, 39]. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLASTN [40] и RDP Classifier [41]. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена 16S рРНК выделенных чистых культур бактерий депонированы в GenBank под номерами OM416237 – OM416243.

Анализ физико-химических свойств стали, подвергнутой биокоррозии. Жидкие питательные среды разливали в бактериологические пробирки и анаэробные пробирки Хангейта (в случае СРБ) по 10 мл в каждую. В пробирки с питательной средой вносили стерильные бруски стальной арматуры (ГОСТ 5781-82) длиной 2–3 см и диаметром 0.5 см. Стерилизацию брусков проводили в автоклаве при давлении $P_{\text{изб.}} = 10.1 \times 10^4$ Па в течение 60 мин. Затем в пробирки с соответствующей питательной средой и стальными брусками вносили суспензию соответствующей чистой культуры микроорганизмов в концентрации 10^8 кл./мл по 1 мл в каждую пробирку (кроме контрольных). Контрольные пробирки не содержали клеток бактерий. Инкубирование культур в пробирках проводили при температуре 14 и 28°C в течение 4 нед.

После месяца инкубирования брусков арматуры (ГОСТ 5781–82) в пробирках с выделенными из прибрежной зоны Баренцева моря чистыми культурами потенциально коррозионно-активных микроорганизмов проводили анализ физико-химических изменений материала с использованием комплекса аналитических методов. Первоначально образцы корродирующей стальной арматуры исследовали с применением цифрового оптиче-

ского стереомикроскопа Leica M250C (“Leica Microsystems”, Германия), интегрированного с цифровой камерой Leica DFC290 для захвата изображения. При этом были выбраны участки поверхности с признаками заметных изменений, которые в дальнейшем анализировали методом сканирующей электронной микроскопии. Эти исследования были выполнены с использованием настольного растрового сканирующего электронного микроскопа ТМ 3000 (“Hitachi”, Япония), оснащенного приставкой энергодисперсионного микроанализа Oxford, в ресурсном центре “Микроскопия и микроанализ” Санкт-Петербургского государственного университета (Россия).

Для определения качественного фазового состава образцов был использован порошковый дифрактометр D2 Phaser (“Bruker”, Германия) с кобальтовым анодом. Рентгенограммы получали при комнатной температуре в интервале $2\theta = 5-70^\circ$. Фазовый анализ проводили с помощью базы данных PDF-2 (ICDD, США).

Все микробиологические, биохимические и аналитические эксперименты осуществляли в трех независимых повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и идентификация чистых культур коррозионно-активных микроорганизмов. Развитие выделенных накопительных культур потенциально коррозионно-активных микроорганизмов на соответствующих питательных средах оценивали визуально и спектрофотометрически (λ 575 нм) на 3 и 7 сут культивирования. На 3 сут культивирования в накопительных культурах, полученных из соскобов обрастаний с конструкционных материалов, расположенных на стенде в литоральной зоне, наблюдали рост аммонифицирующих микроорганизмов. Также на 3 сут наблюдали рост железобактерий в накопительных культурах, полученных из соскобов биоопенок с исследуемых конструкционных материалов, расположенных в атмосферной зоне. Рост сероокисляющих, сульфатредуцирующих и нитрифицирующих микроорганизмов на 3 сут культивирования отсутствовал. На 7 сут культивирования наблюдали рост всех исследуемых групп аэробных микроорганизмов, наиболее интенсивный — при высеве из образцов, экспонированных в атмосферной зоне. Следует отметить, что рост сероокисляющих бактерий, выделенных из обрастаний арматуры с защитным покрытием, был слабее в атмосферной зоне, но активнее — в литоральной. Активно растущие железобактерии гетеротрофные микроорганизмы выделялись, в основном, из атмосферной зоны. При этом наиболее интенсивный их рост наблюдали при высеве из обрастаний стальной арматуры. Культуры железобактерий из обрастаний образцов как с за-

щитным покрытием, так и без него, экспонированных в атмосферной зоне, показывали лучший рост по сравнению с культурами из литоральной зоны. Отсутствовал рост железобактерий только при посеве соскобов с бетона из литоральной зоны. Накопительные культуры анаэробных СРБ на 7 сут показывали рост и образование сероводорода только с образцов соскобов обрастаний бетона и стальной арматуры, экспонированных в литоральной зоне. При этом защитное покрытие на стальной арматуре не способствовало ингибированию роста СРБ.

Для получения чистых культур бактерий и последующей их идентификации по гену, кодирующему 16S рРНК, были отобраны накопительные культуры сульфатредуцирующих, железобактерий и сероокисляющих бактерий, выделенных с соскобов обрастаний на образцах бетона, дерева и стальной арматуры, экспонированных в атмосферной и литоральной зонах.

По результатам секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК полученные чистые культуры бактерий были идентифицированы следующим образом: сульфатредуцирующие из литоральной зоны — *Desulfovibrio* sp. 7Л (96.16% сходства с *Desulfovibrio vulgaris* DP4), *Halodesulfovibrio* sp. 10Л (99.6% сходства с *Halodesulfovibrio* sp. МК-HDV); железобактерии из атмосферной зоны — *Rhodococcus* sp. 1А (94.19% сходства с *Rhodococcus* sp. PDD-25b-12), *Micrococcus* sp. 3А (96.89% сходства с *Micrococcus luteus* U2 ecto 7), *Bacillus* sp. 4А (97.57% сходства с *Bacillus velezensis* PM19) и *Pseudomonas fluorescens* (99.8% сходства с *Pseudomonas* sp. ADAK22), из литоральной зоны — *Acinetobacter* sp. 11Л (95.72% сходства с *Acinetobacter johnsonii* NF114); сероокисляющие из атмосферной зоны — *Paracoccus* sp. 1А (93.53% сходства с *Paracoccus* sp. 49B05), из литоральной зоны — *Dietzia* sp. 12Л (96.41% сходства с *Dietzia* sp. J4S9).

Микробиологические и физиолого-биохимические свойства выделенных коррозионно-активных микроорганизмов. Проведенный нами молекулярный анализ филогенетического состава сообществ микроорганизмов в пробах воды, отобранных на литорали Кислой губы Баренцева моря, показал, что до 20% от всех бактерий, ассоциированных с частичками взвеси, приходилось на представителей рода *Pseudomonas* [11]. Культура *Pseudomonas fluorescens* ССМ 2115 на агаризованной питательной среде Захаровой для железобактерий образовывала маслянистые колонии кремового цвета с гладкой поверхностью и каплевидным профилем. Клетки представляли собой слегка изогнутые подвижные палочки с округлыми концами, часто располагались в цепочках по 2–4 клетки. Грамотрицательные, но в старых культурах клетки могли окрашиваться как грамположительные. *Pseudomonas fluorescens* ССМ 2115 —

аэробная хемоорганогетеротрофная бактерия. Оптимальная температура роста 28–29°C, медленно растет при 4°C, не растет при 45°C. Оптимальный диапазон pH для роста – 5.5–8.5; наблюдали также замедленный рост при pH 9.5–10.5, поэтому этот микроорганизм можно отнести к щелочеустойчивым нейтрофилам с оптимумом pH 6.5. Был отмечен рост на питательной среде Захаровой с концентрацией NaCl от 0 до 5%, при большей концентрации NaCl (от 6 до 10%) рост отсутствовал.

Бактерии *Bacillus* sp. на агаризованной питательной среде Захаровой для железокисляющих бактерий образовывали белые матовые колонии. Клетки имели форму палочек с закругленными концами, часто формировали парные сочетания. Эти грамположительные бактерии, образующие овальные эндоспоры, были отнесены к мезофильным (оптимальная температура для роста 28°C), факультативно анаэробным микроорганизмам.

Культура сероокисляющих бактерий *Dietzia* sp. на агаризованной питательной среде Бейеринка образовывала прозрачные, точечные колонии. Клетки очень мелкие (преимущественно парные кокки, также встречались и одиночные кокки), окрашивались по Граму положительно, оптимум pH для роста 7.0–8.0. Это аэробные, психротолерантные мезофилы (температурный оптимум для роста 28°C, наблюдался слабый рост при 4°C). При росте данной культуры на жидкой питательной среде Бейеринка для сероокисляющих бактерий, содержащей тиосульфат, в ходе микроскопирования отмечались отложения молекулярной серы (как промежуточного продукта окисления тиосульфата) вне клеток и снижение pH среды за счет образования сульфатов.

Температурный оптимум роста для сульфатредуцирующих бактерий *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. составил 25–30°C. При этом *Desulfovibrio* sp. являлся мезофилом, а *Halodesulfovibrio* sp. мог быть отнесен к психротолерантным мезофилам (наблюдали замедленный рост при 4°C). Облигатные анаэробы. Выделенные в чистые культуры *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. были способны активно расти с образованием H₂S при pH от 6.0 до 8.5; оптимальное значение pH для роста обеих сульфатредуцирующих бактерий – 7.5 (нейтрофилы). Установлено, что изменение концентрации NaCl и MgCl₂ в составе питательной среды в диапазоне 0–2.5% практически не влияло на рост и образование сероводорода культурами *Desulfovibrio* sp. Однако культура *Halodesulfovibrio* sp. резко снижала скорость роста при концентрации NaCl ≤ 0.5%, а наилучший рост и образование сероводорода наблюдали при концентрации NaCl, равной 3%, то есть это галотолерантная бактерия. При изучении способности *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp. использовать различные доноры электронов было показано, что обе куль-

Таблица 2. Рост сульфатредуцирующих бактерий, выделенных в чистые культуры из литоральной зоны Кислой губы Баренцева моря, при использовании различных доноров электронов

Донор электронов (мМ)	<i>Desulfovibrio</i> sp.	<i>Halodesulfovibrio</i> sp.
Формиат (10)	+	+
Ацетат (10)	–	+
Пропионат (15)	–	–
Бутират (10)	–	–
Лактат (20)	+	+
Пируват (20)	+	+
Малат (10)	–	+
Фумарат (10)	+	–
Глицерол (10)	+	+
Серин (10)	–	+
Хлорид холина (5)	–	+
Бензоат (1)	–	+

Примечание: (+) – наличие роста; (–) – отсутствие роста.

туры хорошо росли и образовывали сероводород на лактате, пирувате, формиате и глицероле в качестве донора электронов. Бактерии *Halodesulfovibrio* sp. проявляли способность к использованию более широкого спектра доноров электронов, в частности, серина, хлорида холина и бензоата (табл. 2).

Desulfovibrio sp. и *Halodesulfovibrio* sp. на агаризованных питательных средах Видделя для морских форм СРБ и Постгейта С в строго анаэробных условиях образовывали на 5–7 сут культивирования ярко выраженные черные (из-за осаждения FeS) круглые колонии диаметром 1–2 мм. Клетки подвижные, неспорообразующие, вибрион-подобные, изогнутые палочки размерами 0.5–1.0 × 3.0–5.0 мкм, грамотрицательные, каталазоположительные.

Биокоррозия стальной арматуры с участием выделенных в чистые культуры микроорганизмов. Для эксперимента с биокоррозией брусков арматуры (ГОСТ 5781–82) были изначально взяты 7 культур железокисляющих бактерий (выделенных из образцов 1А, 3А, 4А, 11Л и 12Л), 2 культуры сероокисляющих бактерий (выделенных из образцов 1А и 12Л) и 2 культуры сульфатредуцирующих бактерий (выделенных из образцов 7Л и 10Л). Контролем служили бруски арматуры, помещенные в соответствующие стерильные питательные среды, не засеянные микроорганизмами.

На 6 сут культивирования при температуре 28°C был отмечен рост *Pseudomonas fluorescens* и культуры бактерий *Bacillus* sp., выделенной из образца 4А. При этом визуально наблюдалось расслоение: вокруг бруска арматуры культуральная жидкость была прозрачная, затем шла полоса ко-

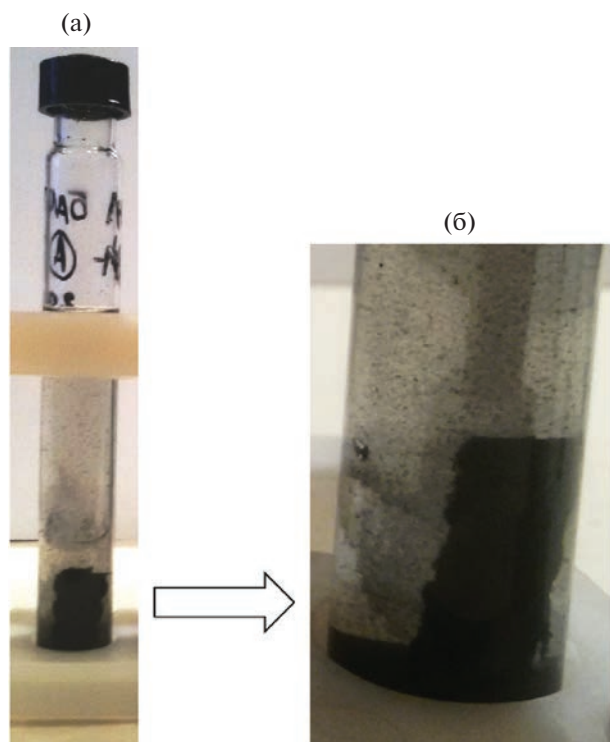


Рис. 1. Брусок стальной арматуры в питательной среде Видделя, инокулированной *Desulfovibrio* sp., на 14 сут культивирования (а, б – при увеличении, виден черный осадок нерастворимого в воде сульфида железа FeS).

ричного цвета (по всей видимости, состоящая из оксидов железа) и вверху – светло-зеленая культуральная жидкость. На 13 сут культивирования рост наблюдали во всех пробирках, отмечалось потемнение и помутнение питательной среды Захаровой для железобактерий. На 18 сут культивирования питательная среда в пробирках с железобактериями еще сильнее потемнела, особенно при температуре 28°C.

В пробирках с сероокисляющими бактериями на 13 сут культивирования наблюдали лишь легкое помутнение питательной среды Бейеринка. При температуре 28°C был более интенсивный рост всех выделенных чистых культур железобактерий, чем при температуре 14°C. Через месяц культивирования питательная среда в пробирках с культурами выделенных железобактерий, растущих при 28°C, стала черно-коричневой, непрозрачной, прозрачная полоса рядом с бруском арматуры исчезла. В культурах, растущих при 14°C, питательная среда за месяц лишь слегка потемнела, полоса рядом с бруском арматуры сохранилась. В контрольных пробирках с питательной средой Захаровой (исходно светло-зеленого цвета) только через четыре недели наблюдалось незначительное потемнение, что связано, очевидно, с химическим окислением. В пробир-

ках с сероокисляющими бактериями изменения цвета питательной среды Бейеринка в течение всего процесса культивирования не наблюдали.

На 3 сут культивирования при температуре 28°C был отмечен хороший рост чистых культур *Desulfovibrio* sp. и *Halodesulfovibrio* sp., выделенных из литоральных образцов 7Л (бетон) и 10Л (стальная арматура) соответственно. При этом визуально в течение культивирования наблюдалось возрастающее накопление в пробирках черного осадка FeS, нерастворимого в воде и формирующегося при взаимодействии железа с образующимся бактериями сероводородом (рис. 1). На 20 сут культивирования питательная среда в пробирках с культурами СРБ еще сильнее почернела, частицы сульфида железа полностью покрыли густым слоем бруски стальной арматуры.

Электронно-микроскопический и рентгенофазовый анализ (РФА) биокоррозионных повреждений. Для определения степени коррозионной активности бактерий из Баренцева моря в отношении арматурной стали (ГОСТ 5781-82) были взяты образцы стальной арматуры после культивирования в течение 1 месяца с *Bacillus* sp. (из образца арматуры 4А, атмосферная зона), *Pseudomonas fluorescens* (из образца бетона 1А, атмосферная зона), *Dietzia* sp. (из образца арматуры с защитным покрытием 12Л, литоральная зона), *Desulfovibrio* sp. (из образца бетона 7Л, литоральная зона) и *Halodesulfovibrio* sp. (из образца арматуры 10Л, литоральная зона).

Как видно из рис. 2б, в присутствии аэробных железобактерий *P. fluorescens* на стальной арматуре в течение месяца появлялись интенсивные пятна ржаво-коричневого цвета (аналогичную картину наблюдали и для *Bacillus* sp.), в отличие от контроля (рис. 2а). В случае сероокисляющих бактерий ржавые зоны биокоррозии были незначительными, мало отличавшимися от контрольного варианта.

Под воздействием сульфатредуцирующих бактерий на стальной арматуре протекали активные коррозионные процессы, приводившие к заметным изменениям поверхностного слоя материала. Были отмечены существенные изменения поверхности в сравнении с контрольным вариантом (рис. 2в), что проявлялось в отложении продуктов биокоррозии на поверхности арматуры, а также в образовании глубоких каверн (рис. 2г–2е). В контроле было зафиксировано незначительное и равномерное отложение продуктов коррозии арматуры, однако образования каверн не происходило.

С использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) была изучена микроструктура поверхности образцов арматуры (ГОСТ 5781–82), находящихся в течение месяца в соответствующих питательных средах (контроль) и в питательных средах, засеянных выделенными чистыми культурами коррозионно-активных бактерий раз-

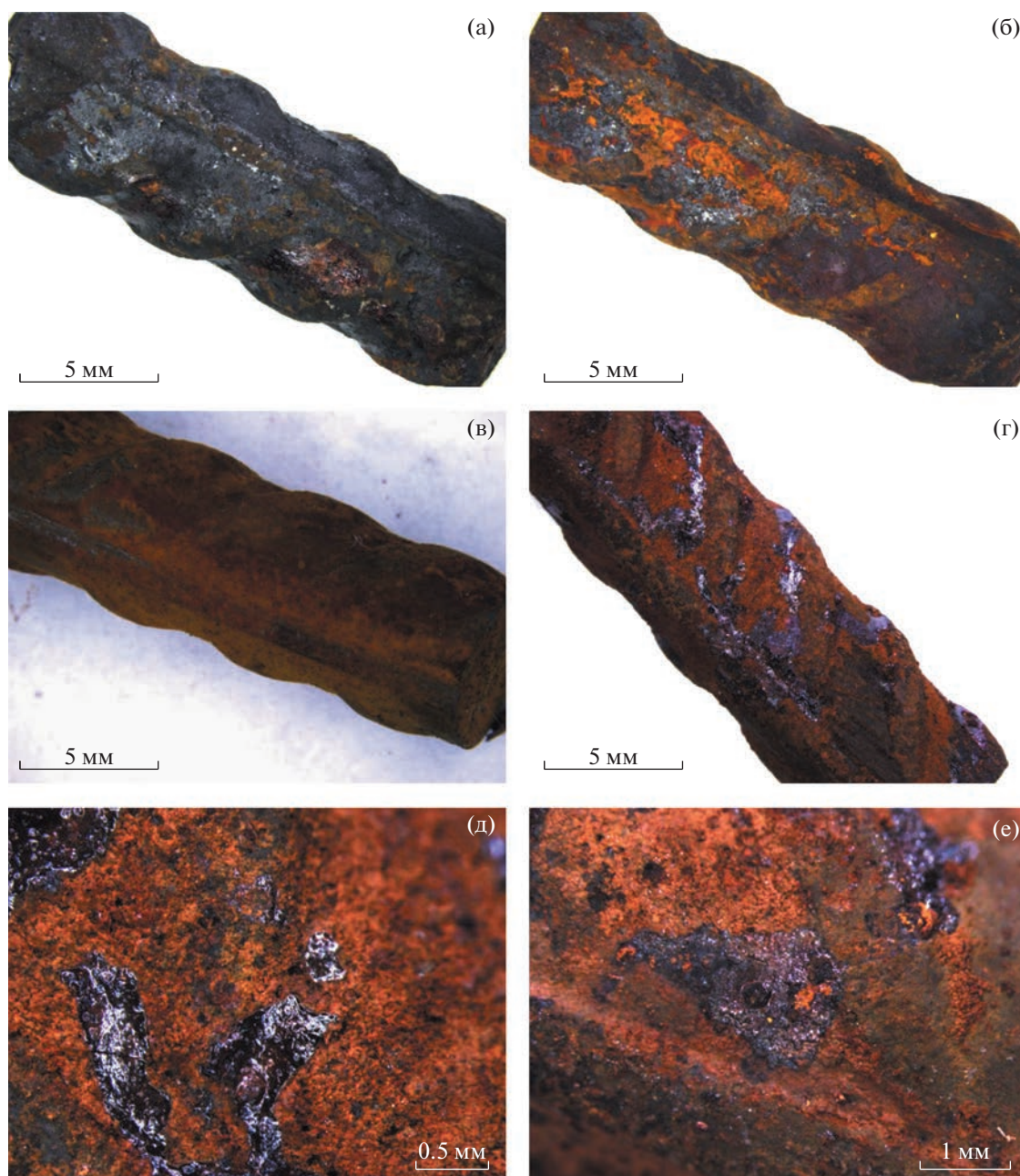


Рис. 2. Арматура из конструкционной стали (ГОСТ 5781–82) после 28 сут экспозиции, вид под бинокляром. В питательной среде Захаровой: а – контроль; б – в присутствии культуры *Pseudomonas fluorescens*; в питательной среде Видделя: в – контроль; г – в присутствии культуры *Desulfovibrio* sp.; коррозия под действием сульфатредуцирующих бактерий: д – *Desulfovibrio* sp.; е – *Halodesulfovibrio* sp.

личных физиологических групп (рис. 3). В образцах арматуры, подвергнутых воздействию железо- и сероокисляющих бактерий, а также в особенности анаэробных сульфатредуцирующих бактерий, на поверхности металла были хорошо заметны значительные биокоррозионные повреждения, в том числе питтинги и каверны. На таких участках зафиксированы продукты коррозии различной морфологии. Так, в варианте с культурой *Dietzia* sp. отмечены ламеллярные кристаллические образо-

вания на поверхности стали (рис. 3б), которые отсутствовали в контроле (рис. 3а). В варианте с *Bacillus* sp. зафиксировано образование призматических кристаллов (рис. 3г), а в варианте с *Pseudomonas fluorescens* обнаружено формирование многочисленных глобулярных структур (рис. 3д) на поврежденной поверхности стали, которые также отсутствовали в контроле (рис. 3в).

СЭМ-анализ образцов показал, что поверхностные биокоррозионные отложения на стальной ар-

матуре в вариантах с сульфатредуцирующими бактериями также характеризовались формированием кристаллических структур. При этом проявление коррозии стали существенно отличалось от того, что наблюдали во всех вариантах с аэробными железозакисляющими бактериями. При экспозиции брусков арматуры с обоими выделенными штаммами СРБ образовывались характерные каверны (рис. 3ж–3з), которые отсутствовали в контроле (рис. 3е). Наиболее активное формирование каверн на поверхности стальной арматуры наблюдали в варианте с *Desulfovibrio* sp.

Ниже приведены суммарные результаты по анализу химических элементов, идентифицированных на поверхности образцов стальной арматуры после 28 сут экспозиции (спектральный энергодисперсионный микроанализ 3–6 точек зондирования).

В контроле с питательной средой Захаровой для железозакисляющих бактерий (атомный процент, ат. %): С (9.844), Fe (35.233), О (54.923).

В образце с культурой железозакисляющей бактерии *Bacillus* sp. (ат. %): Р (0.045), S (0.133), Мп (0.159), Al (0.187), Si (0.459), Na (0.474), Ca (3.738), С (10.423), Fe (28.847), О (55.535).

В образце с культурой железозакисляющей бактерии *Pseudomonas fluorescens* (ат. %): S (0.089), Р (0.098), Мп (0.176), Al (0.354), Si (1.052), Na (1.572), С (12.530), Fe (27.479), О (56.650) – рис. 4а.

В контроле с питательной средой Бейеринка для серозакисляющих бактерий (ат. %): S (0.117), Si (0.282), Na (0.316), Мп (0.352), Ca (0.473), С (10.610), Fe (32.366), О (55.484).

В образце с культурой серозакисляющей бактерии *Dietzia* sp. (ат. %): Si (0.145), S (0.214), Mg (0.488), Мп (0.776), Ca (3.192), С (12.091), Fe (26.809), О (56.285).

В контроле с питательной средой Видделя для морских сульфатредуцирующих бактерий (ат. %): Cl (0.516), Р (0.591), Si (1.864), Fe (32.482), О (64.547).

В образцах с культурами сульфатредуцирующих бактерий (ат. %), для *Desulfovibrio* sp.: Cl (0.110), Р (0.220), Ca (0.524), Si (0.539), Na (1.686), S (9.927), Fe (24.317), О (62.677); для *Halodesulfovibrio* sp.: Si (0.726), Na (1.194), Ca (1.592), S (18.667), Fe (27.411), О (50.410) – рис. 4б.

Состав химических элементов в нескольких точках исследованных образцов поверхности стальной арматуры с кристаллическими структурами показал высокое содержание серы в образцах, экспонировавшихся с чистыми культурами СРБ, что отличалось от образцов с аэробными коррозионно-активными культурами железозакисляющих бактерий, где содержание серы было незначительно. При этом в контрольном варианте (питательная среда Видделя для морских форм СРБ) сера выявлена не была.

При анализе рентгенограмм, полученных для образцов стальной арматуры при культивировании с железозакисляющими бактериями, дифракционные максимумы не обнаружены, образцы оказались рентгеноаморфны. Этот результат, несмотря на наличие в продуктах коррозии кристаллических структур (по результатам сканирующей электронной микроскопии), может быть связан с низким содержанием кристаллического материала для определения методом рентгенофазового анализа (РФА).

РФА продуктов биокоррозии арматуры из конструкционной стали ГОСТ 5781–82 (рис. 5) продемонстрировал, что в присутствии выделенных чистых культур СРБ родов *Desulfovibrio* и *Halodesulfovibrio* в результате коррозии стали образуется фосфат железа $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8 H_2O$ (аналог минерала вивианита), а также вследствие восстановления серы до степени окисления 2 образуется сульфид кальция CaS (аналог минерала ольдгамита). Кроме того, в случае *Halodesulfovibrio* sp. на рентгенограмме определяется сера, которая является продуктом восстановления сульфат-ионов. На электронных (СЭМ) микрофотографиях были отмечены кристаллы различной морфологии – призматические кристаллы вивианита и уплощенные пирамидальные кристаллы серы.

Таким образом, из образцов обрастаний различных конструкционных материалов (стальная арматура, бетон, дерево), экспонированных в литоральной и атмосферной зонах в районе Кислой губы Баренцева моря, были получены накопительные и чистые культуры бактерий, относящихся к ключевым группам коррозионно-активных микроорганизмов – железозакисляющим, сульфатредуцирующим, серозакисляющим, нитрифицирующим и аммонифицирующим. По результатам определения нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК идентифицированы чистые культуры железозакисляющих (*Rhodococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*), сульфатредуцирующих (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.) и серозакисляющих (*Paracoccus* sp., *Dietzia* sp.) бактерий.

Отмечено проявление биокоррозии на образцах арматуры (ГОСТ 5781–82), инокулированных выделенными в чистые культуры железозакисляющими (*Pseudomonas fluorescens*) и сульфатредуцирующими (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.) бактериями, а также изменения структуры и минерального состава поверхностного слоя стальной арматуры, что показано с помощью сканирующей электронной микроскопии и РФА. Расширено представление о проявлениях биокоррозии, связанных с конкретными видами микроорганизмов. При этом наибольшую активность в раз-

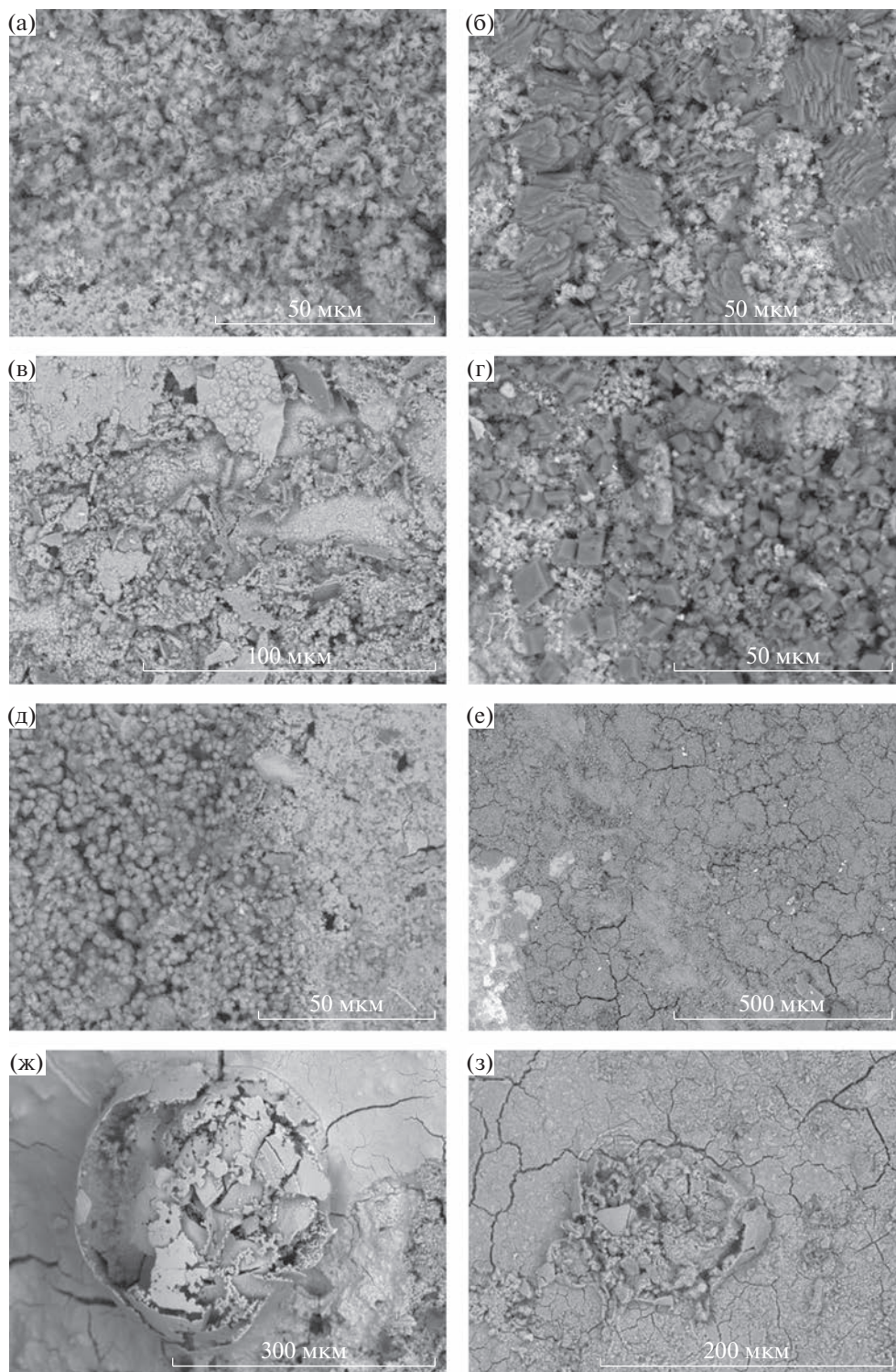


Рис. 3. Электронные (СЭМ) микрофотографии структуры поверхности стальной арматуры после 28 сут экспозиции. В питательной среде Бейеринка: а – контроль; б – с культурой *Dietzia* sp.; в питательной среде Захаровой: в – контроль; г – с культурой *Bacillus* sp.; д – с культурой *Pseudomonas fluorescens*; в питательной среде Видделя: е – контроль; ж – с культурой *Desulfovibrio* sp.; з – с культурой *Halodesulfovibrio* sp.

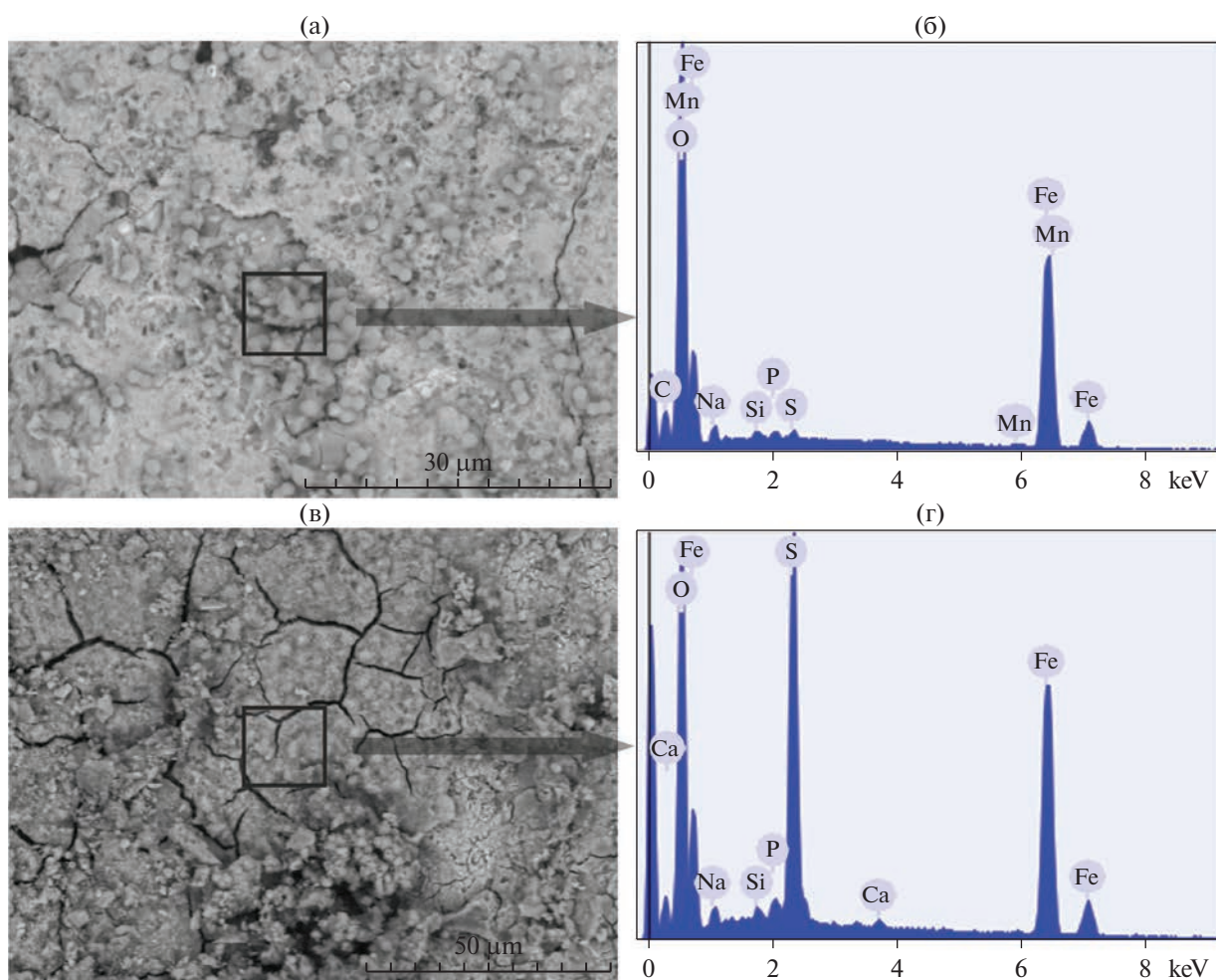


Рис. 4. Спектры, полученные в ходе энергодисперсионного микроанализа химического состава поверхности стальной арматуры после 28 сут экспозиции: а – в питательной среде Захаровой с культурой *Pseudomonas fluorescens*; в – в питательной среде Видделя с культурой *Desulfovibrio* sp. На а и в показаны точки, где были получены соответствующие спектры (б, г).

витии коррозионных процессов проявили сульфатредуцирующие бактерии, выделенные из литоральной зоны Баренцева моря. Очевидно, что их роль в сочетании с коррозионной активностью морской воды способна заметно влиять на состояние материалов и конструкций в прибрежной зоне арктических морей.

Полученные результаты свидетельствуют об активном участии бактерий различных физиологических групп, в особенности СРБ, в процессах трансформации поверхностного слоя стальной арматуры. Образование минеральных фаз в продуктах коррозии зависит от штаммов указанных бактерий и, очевидно, связано с особенностями их метаболизма. Все выделенные в чистые культуры из литоральной зоны Баренцева моря штаммы могут быть отнесены к представителям коррозионно-активного микробного сообщества. Очевидно, что биопленки, сформированные бактериями из различных таксономических групп, могут также

играть ключевую роль для последующего развития на поверхности различных конструктивных материалов макрообрастаний за счет создания условий, способствующих их закреплению и дальнейшему развитию. Полученные данные важны для понимания процессов биокоррозии сталей и железобетонных, применяемых в морском климате арктических широт.

Авторы выражают благодарность техническому директору Кислогубской ПЭС (АО «Ленинградская ГАЭС» ПАО «РусГидро») М.М. Нурмагомедову за помощь в проведении натуральных испытаний конструктивных материалов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-17-00141 по теме «Современное минералообразование при участии микроорганизмов», а также в рамках государственного задания кафедры микробиологии МГУ по теме «Физиология и биохимия фототрофных и хемотрофных микроорганизмов» (ЦИТиС № 121032300094-7). Иссле-

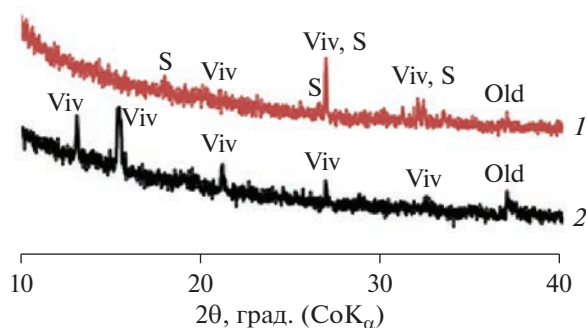


Рис. 5. Рентгенограммы фазового состава поверхности образцов стальной арматуры после 28 сут экспозиции с культурами *Halodesulfobivrio* sp. (1) и *Desulfovibrio* sp. (2) в питательной среде Видделя. Viv – вивинит, S – сера, Old – ольдамит.

дования проведены с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ “Рентгенодифракционные методы исследования” и “Микроскопии и микроанализа”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Beech I.B., Sunner J. // *Biotechnol.* 2004. V. 15. № 3. P. 181–186.
- Kip N., van Veen J.A. // *ISME J.* 2015. V. 9. № 3. P. 542–551.
- Bryukhanov A.L., Vlasov D.Y., Maiorova M.A., Tsarovtseva I.M. // *Power Technol. Eng.* 2021. V. 54. № 5. P. 609–614.
- Nyanikova G., Bryukhanov A., Vlasov D., Mayorova M., Nurmagedev M., Akhaev D., Tsarovtseva I. // *E3S Web Conf.* 2020. V. 215. P. 1–9 (04001). <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202021504001>
- Videla H.A., Herrera L.K. // *Int. Microbiol.* 2005. V. 8. № 3. P. 169–180.
- Ma Y., Zhang Y., Zhang R., Guan F., Hou B., Duan J. // *Biotechnol.* 2020. V. 104. № 2. P. 515–525.
- Procópio L. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 35. № 5. P. 73. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2647-4>
- Procópio L. // *Arch. Microbiol.* 2022. V. 204. № 2. P. 138. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02755-7>
- Amendola R., Acharjee A. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 806688. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.806688>
- Loto C.A. // *J. Adv. Manuf. Technol.* 2017. V. 92. P. 4241–4252.
- Bryukhanov A.L., Majorova M.A., Tsarovtseva I.M. // *Limnol. Freshw. Biol.* 2020. V. 3. № 4. P. 969–970.
- Kim B.H., Lim S.S., Daud W.R., Gadd G.M., Chang I.S. // *Bioresour. Technol.* 2015. V. 190. P. 395–401.
- Moura V., Ribeiro I., Moriggi P., Capao A., Salles C., Bitati S., Procópio L. // *Arch. Microbiol.* 2018. V. 200. № 10. P. 1447–1456.
- Enning D., Venzlaff H., Garrelfs J., Dinh H.T., Meyer V., Mayrhofer K. et al. // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. № 7. P. 1772–1787.
- Etim I.N., Wei J., Dong J., Xu D., Chen N., Wei X., Su M., Ke W. // *Biofouling.* 2018. V. 34. № 10. P. 1121–1137.
- Mustin C., Berthelin J., Marion P., de Donato P. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. № 4. P. 1175–1182.
- López A.I., Marín I., Amils R. // *Microbiologia.* 1994. V. 10. № 1–2. P. 121–130.
- Inaba Y., Xu S., Vardner J.T., West A.C., Banta S. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. № 21. e01381–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01381-19>
- Huang Y., Xu D., Huang L.Y., Lou Y.T., Muhadesi J.B., Qian H.C., Zhou E.Z., Wang B.J., Li X.T., Jiang Z., Liu S.J., Zhang D.W., Jiang C.Y. // *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2021. V. 7. № 1. P. 6.
- Emerson D. // *Biofouling.* 2018. V. 34. № 9. P. 989–1000.
- Maeda T., Negishi A., Komoto H., Oshima Y., Kamimura K., Sugio T. // *J. Biosci. Bioeng.* 1999. V. 88. № 3. P. 300–305.
- Makita H. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 8. P. 110.
- Ravenschlag K., Sahm K., Knoblauch C., Jørgensen B.B., Amann R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 8. P. 3592–3602.
- Muyzer G., Stams A.J.M. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. № 6. P. 441–454.
- Hamilton W.A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1985. V. 39. P. 195–217.
- Dinh H.T., Kuever J., Mussmann M., Hassel A.W., Stratmann M., Widdel F. // *Nature.* 2004. V. 427. № 6977. P. 829–832.
- Enning D., Garrelfs J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 4. P. 1226–1236.
- Videla H.A. // *Biofouling.* 2000. V. 15. № 1–3. P. 37–47.
- Ziadi I., Alves M.M., Taryba M., El-Bassi L., Hassairi H., Bousselmi L., Montemor M.F., Akrouf H. // *Bioelectrochemistry.* 2020. V. 132. P. 107413.
- Yang S.S., Lin J.Y., Lin Y.T. // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 1998. V. 31. № 3. P. 151–164.
- Zhang Y., Ma Y., Duan J., Li X., Wang J., Hou B. // *Biofouling.* 2019. V. 35. № 4. P. 429–442.
- Захарова Ю.П., Парфенова В.В. // *Известия РАН. Серия Биологическая.* 2007. № 3. С. 290–295.
- Widdel F., Bak F. *The Prokaryotes.* 2 Ed. / Eds. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer. N.Y.: Springer-Verlag. 1992. V. 4. P. 3352–3378.
- Брюханов А.Л., Непрусов А.И., Шестаков А.И., Комова И.Б. *Методы исследования анаэробных микроорганизмов.* М.: Научная библиотека МГУ, 2015. 178 с.
- Beijerinck M.W. // *Archs. Neerl. Science Series.* 1904. V. 29. P. 131–157.
- Issayeva A.U., Pankiewicz R., Otarbekova A.A. // *Pol. J. Environ. Stud.* 2020. V. 29. № 6. P. 4101–4108.
- Trüper H.G., Schlegel H.G. // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1964. V. 30. P. 225–238.
- Lane D.J. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic.* / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. Chichester: John Wiley & Sons. 1991. P. 115–175.
- Herlemann D.P., Labrenz M., Jurgens K., Bertilsson S., Waniek J.J., Andersson A.F. // *ISME J.* 2011. V. 5. № 10. P. 1571–1579.
- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. // *BMC Bioinformatics.* 2009. V. 10. P. 421.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267.

Corrosive Activity of Microorganisms Isolated from Fouling of Structural Materials in the Coastal Zone of the Barents Sea

D. Yu. Vlasov^{a, f, *}, A. L. Bryukhanov^b, G. G. Nyanikova^c, M. S. Zelenskaya^a,
I. M. Tsarovtseva^d, and A. R. Izatulina^e

^a*Saint Petersburg State University, Faculty of Biology, Saint Petersburg, 199034 Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119234 Russia*

^c*Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University),
Faculty of Chemical and Biotechnology, Saint Petersburg, 190013 Russia*

^d*Vedeneev All-Russian Scientific Research Institute of Hydraulic Engineering, Saint Petersburg, 195220 Russia*

^e*Saint Petersburg State University, Institute of Earth Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia*

^f*Komarov Botanical Institute of RAS, Saint Petersburg, 197376 Russia*

**e-mail: dmitry.vlasov@mail.ru*

Potentially corrosive active microorganisms isolated from structural materials with signs of biofouling on the coast of Kislaya Bay (Barents Sea, Russia) were studied: sulfate-reducing, iron-oxidizing and sulfur-oxidizing bacteria. Cultures of sulfate-reducing bacteria (*Desulfovibrio* sp., *Halodesulfovibrio* sp.), sulfur-oxidizing bacteria (*Dietzia* sp.), and iron-oxidizing bacteria (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus* sp.) were identified on the basis of the determining the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene. The methods of scanning electron microscopy, energy dispersive microanalysis of the chemical composition and X-ray phase analysis revealed significant changes in the structure and chemical composition of the surface layer of steel reinforcement samples exposed for 28 days in the presence of isolated microorganisms that demonstrated their active participation in corrosion processes. It has been shown that the formation of mineral analogues in corrosion products depends on the strains of studied bacteria and peculiarities of their metabolism. Sulfate-reducing bacteria isolated from the littoral zone of the Barents Sea showed the highest activity in the development of corrosion processes.

Keywords: sulfate-reducing bacteria (SRB), sulfur-oxidizing bacteria, iron bacteria, Barents Sea, structural materials, biocorrosion, scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction

УДК 582.282.123.4:577.152.34

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ – АКТИВАТОРА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ, ОБРАЗУЕМОЙ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus terreus* 2

© 2023 г. Е. С. Звонарева¹, А. А. Осмоловский¹, *, Н. А. Баранова¹, И. Б. Котова¹, В. Г. Крейер¹

¹Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 17.01.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Из культуральной жидкости микромицета *A. terreus* 2 выделена внеклеточная протеиназа – активатор прекалликреина плазмы крови человека, изучены физико-химические, кинетические и биохимические свойства. Установлено, что внеклеточная протеиназа *A. terreus* 2 представляла собой сериновую гликозилированную протеиназу с изоэлектрической точкой 4.6, молекулярной массой ~37 кДа и оптимумом pH для проявления активности 10.0 и температуры 37°C. По ряду свойств выделенная протеиназа сходна с протеиназой-активатором протеина С, синтезируемой микромицетом *A. ochraceus* L-1.

Ключевые слова: активаторы прекалликреина, протеиназы микромицетов, препаративное изоэлектрофокусирование, *Aspergillus terreus*

DOI: 10.31857/S0555109923040207, EDN: QZVABD

В последнее время микроскопические грибы различных видов изучаются как продуценты протеолитических ферментов, способных воздействовать на белки системы гемостаза человека, проявляющих как фибринолитическое, так и активаторное по отношению к факторам свертывания крови действие [1–4]. Наиболее перспективными микромицетами считаются представители рода *Aspergillus*, некоторые протеиназы которых отличаются выраженностью определенных типов активности, оптимальными параметрами активности при физиологических показателях (pH 7–8, 37–40°C), относительной простотой очистки. Среди известных протеиназ аспергиллов известны активаторы таких проферментов плазмы крови как протеина С, фактора X и прекалликреина [5–7]. Ввиду ключевой роли этих белков в формировании тромбов и регуляции этого процесса, разработаны тест-системы на основе протеиназ яда змей, которые используются в диагностике этих белков [8]. Протеиназы аспергиллов, активирующих протеин С и фактор X, активно изучаются [9, 10], в то время как их свойства в качестве активаторов прекалликреина еще не описаны. Одним из известных продуцентов таких протеиназ является микромицет *Aspergillus terreus* 2 [11–13].

Для штаммов вида *A. terreus* известно образование протеиназ, различающихся по субстратной

специфичности и оптимумам pH-активности и термоактивности [14–16].

Ранее были изучены условия глубинного культивирования микромицета *A. terreus* 2 для увеличения секреции протеиназ с плазминоподобной и активирующей прекалликреин активностью. Наибольшая секреция протеиназ достигалась при выращивании микромицета, а также было показана их способность гидролизовать в равной степени фибрин и фибриноген [13, 17].

Цель работы – выделение и изучение свойств внеклеточной протеиназы микромицета *A. terreus* 2.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. В работе использовали штамм микромицета *A. terreus* 2, отобранный в результате предыдущей работы в качестве продуцента протеиназ – активаторов прекалликреина плазмы крови человека [13].

Для получения посевного материала с поверхности культуры микромицета, выращенной в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут при 25°C, проводили смыв спор в качалочные колбы емкостью 750 со 100 мл питательной среды с суслон, глюкозой и пептоном [18]. Через 2 сут выращивания в термостатированном шейкере инкубаторе (ES-20/80, “Biosan”, Латвия) при 28°C и 200

об./мин, часть биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (%): глюкоза – 3.0, глицерин – 7.0, гидролизат рыбной муки – 0.5, NaNO_3 – 0.2, KH_2PO_4 – 0.05, MgSO_4 – 0.05, pH 5.5 [13]. Культивирование микроцета продолжали при тех же условиях в течение 5 сут.

Выделение протеиназы – активатора прекалликреина. Протеиназу выделяли из 1 л фильтрата культуральной жидкости (КЖ) осаждением белков сульфатом аммония при степени насыщения 0.8 на холоду в течение 12 ч, центрифугированием полученного осадка и его последующим диализом в диализных мешках против 0.0001 М Трис-HCl-буфера, pH 8.2. Полученный после диализа раствор лиофильно высушивали. Фракционирование белков полученного препарата осуществляли препаративным изоэлектрофокусированием при 4°C в градиенте pH амфолинов 2.5–5.0 и градиенте плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл (“LKB”, Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч [11, 12]. Во фракциях, полученных с колонки, определяли pH, поглощение при 280 нм и протеолитическую активность. Чистоту протеиназы определяли с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ с Na-ДДС по методу Лэммли.

Для определения молекулярной массы фермента использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (“ThermoScientific”, США). Окрашивание геля осуществляли ацетатно-спиртовым раствором Кумасси бриллиантового синего R-250. Для отмывки геля от красителя использовали 7%-ную уксусную кислоту.

Определение белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм в кювете с длиной пути в 1 см [19].

Определение активности протеиназы *A. terreus* 2. Протеолитическую активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата плазмина – H-D-валил-L-лейцил-L-лизин-p-нитроанилида (H-D-Val-Leu-Lys-pNA), как описано ранее [13]. Активаторную к прекалликреину активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата H-D-пролил-L-фенилаланил-L-аргинин-p-нитроанилида (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA) после предварительной инкубации пробы с плазмой человека как писано в работе [13].

За 1 единицу активности (Е) принимали количество мкмоль *n*-нитроанилина, образующегося в результате гидролиза в 1 мл пробы за 1 мин. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (“Hitachi”, Япония).

Выявление углеводного компонента протеиназы. Углеводный компонент в составе выделенной протеиназы определяли с использованием периодной кислоты и реактива Шиффа (фуксинсернистой кислоты) методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах [20]. В качестве положитель-

ного контроля на реакцию использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы, в качестве отрицательного – БСА, в концентрациях 0.5 мг/мл.

Определение субстратной специфичности. Субстратную специфичность протеиназы определяли по гидролизу хромогенных пептидных субстратов – пара-нитроанилидов, расщепляемых протеиназами системы гемостаза: плазмина – H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251), Ха фактора – Bz-Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA (S-2222) и Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765), урокиназы – pGlu-Gly-Arg-pNA (S-2444), тромбина – Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (Chromozym TH) и тканевого активатора плазминогена – H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288); а также хромогенные субстраты трипсина Bz-Arg-pNA, химотрипсина Ac-Phe-pNA и субтилизина Z-Ala-Ala-Leu-pNA, использовали субстраты с разным сочетанием аминокислот в хромопептиде: Ac-Leu-Gly-Arg-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA, pGlu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA, Suc-Ala-Ala-Ala-pNA и Ac-Leu-Tyr-pNA. Реакции с данными субстратами проводили по методике определения активности как описано выше.

Изучение действия ингибиторов протеиназ. Использовали ингибиторы: ЭДТА (1.1 мг/мл) и *o*-фенантролин (0.5 мг/мл) – ингибиторы металлопротеиназ; *n*-ХМБ (0.5 мг/мл) – ингибитор цистеиновых протеиназ; PMSF (фенилметилсульфонил фторид, 0.3 мг/мл) – ингибитор сериновых протеиназ; TPCK (тозилфенилаланилхлорметилкетон, 0.4 мг/мл) – ингибитор химотрипсиноподобных протеиназ; TLCK (тозиллизинхлорметилкетон, 0.4 мг/мл) и соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл) – ингибиторы трипсиноподобных протеиназ. Действие ингибиторов исследовали в молярном соотношении фермент : ингибитор 1 : 10 и 1 : 100 [15]. Начальную и остаточную протеолитическую активности фермента определяли при 37°C как описано выше после предынкубации фермента с ингибитором в течение 60–120 мин при 25°C и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

Определение физико-химических свойств протеиназы. Кинетические параметры – максимальную скорость реакции (V_{\max}), и константу Михаэлиса (K_m) определяли по гидролизу субстратов плазмина и тромбина, которые использовали в концентрациях 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 мг/мл соответственно. Кинетику реакции снимали в автоматическом режиме при использовании компьютерного обеспечения на спектрофотометре Cary 50 UV-Vis (“Varian”, США). Зависимость скорости реакции от концентрации субстратов строили в координатах Лайнуивера – Берка.

pH-оптимум активности протеиназы определяли в 0.4 М универсальном (натрий-ацетат-фосфат-боратном) буфере со значениями pH от 3.0 до 11.0. К 150 мкл буфера с соответствующим значением pH добавляли 100 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата.

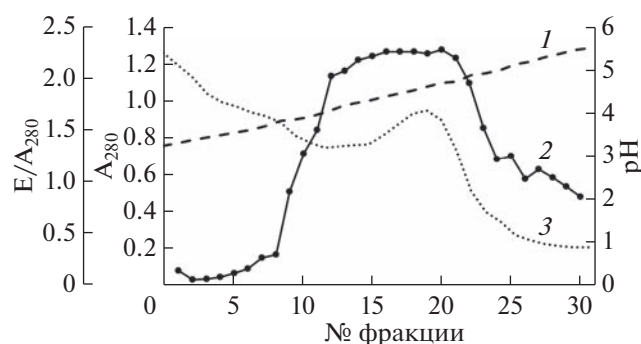


Рис. 1. Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков культуральной жидкости *A. terreus* 2. 1 – pH, 2 – активаторная к прекалликреину активность, 3 – белок.

Для определения pH-стабильности фермента проводили инкубацию протеиназы в растворах буфера с разными значениями pH при 37°C в течение 2 ч, после чего определяли активность с субстратом тромбина. Остаточную активность выражали в % от исходной.

Температурный оптимум действия протеиназы определяли в 0.05 М Трис-НСl-буфере, pH 8.2 по тромбиноподобной активности при 25, 30, 37, 45, 55 и 65°C. Термостабильность фермента оценивали после инкубации фермента при заданных температурах в течение 2 ч и выражали в % от исходной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Протеиназу – активатор прекалликреина, образуемую *A. terreus* 2, выделяли из культуральной жидкости осаждением сульфатом аммония, затем с помощью препаративного колоночного изоэлектрофокусирования. Фракции с наибольшей активаторной к прекалликреину и плазминоподобной активностью имели pI 4.6–4.7 (рис. 1). Удельная активаторная к прекалликреину активность выделенной протеиназы составила $1.1 \text{ E/мг белка} \times 10^{-3}$.

Для проверки гомогенности полученной белковой фракции с наибольшим значением целевых активностей после изоэлектрофокусирования и установления молекулярной массы активного фермента использовали разделение белков с помощью электрофореза в ПААГ с Na-ДДС по методу Лэммли. Было установлено, что внеклеточная протеиназа микромицета *A. terreus* 2 представляла собой белок с молекулярной массой около 37 кДа (рис. 2).

Выявление углеводного компонента у протеиназы-активатора прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2, показало, что фермент гликозилирован (рис. 3). Примечательно, что протеиназа-активатор другого профермента системы

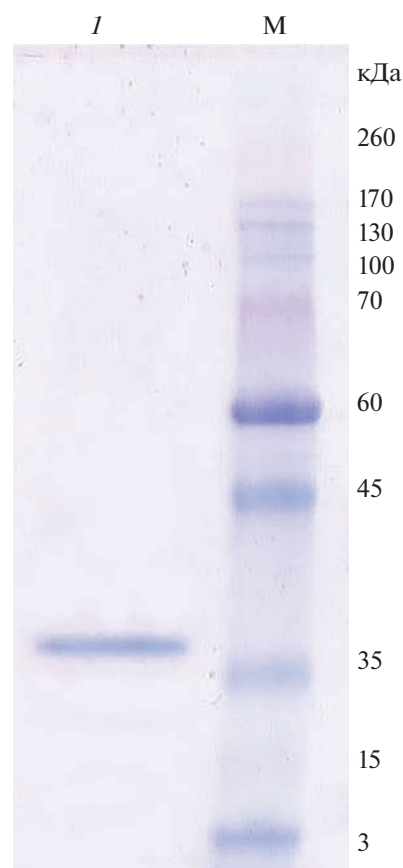


Рис. 2. Денатурирующий электрофорез в ПААГ (по Лэммли) протеиназы – активатора прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2. 1 – активная фракция после изоэлектрофокусирования, М – метки.

гемостаза – протеина С, полученная при культивировании *A. ochraceus* L-1 не была гликозилированным белком [20].

Была изучена субстратная специфичность внеклеточной протеазы *A. terreus* 2 с хромогенными пептидными субстратами. Из представленных в табл. 1 данных видно, что выделенная протеиназа-активатор проявляла высокую протеолитическую активность только с субстратами тромбина и плазмина. С остальными использованными хромогенными субстратами наблюдались лишь следовые активности, вне зависимости от аминокислотной последовательности в хромопептиде. Замена аминокислот в положениях P₁, P₂ и P₃ хромогенных пептидных субстратов не оказывала существенного влияния на их расщепление (табл. 1).

Таким образом, на основе проведенного анализа субстратной специфичности, можно сделать вывод, что протеиназа-активатор прекалликреина, образуемая микромицетом *A. terreus* 2, имела довольно широкую субстратную специфичность. По-видимому, в результате процессинга, протеиназа проявляет автокаталитическую функцию,

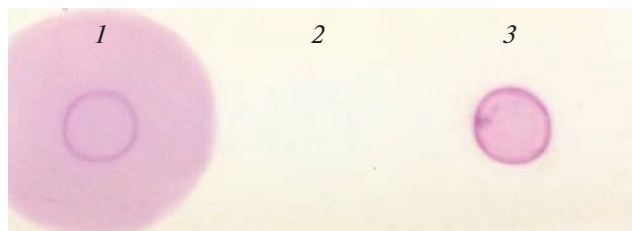


Рис. 3. Результат качественной реакции на гликопротеины с протеиназой – активатором прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2. 1 – инвертаза (положительный контроль); 2 – БСА (отрицательный контроль), 3 – протеиназа *A. terreus* 2.

чем обусловлена ее способность к реакции ограниченного протеолиза – активации прекалликреина – в участке полипептидной цепи, гомологичной по аминокислотному составу, а экскретируясь, она обеспечивает микромицет разнообразием аминокислот, расщепляя различные белковые субстраты.

Кинетические параметры выделенной протеиназы *A. terreus* 2 определяли в реакциях с хромогенными пептидными субстратами плазмина и тромбина. Рассчитанные значения K_m для субстрата H-D-Val-Leu-Lys-pNA составило 3.17 ммоль/мл, V_{max} – 4.16 ммоль/мин × мл. Для субстрата Tos-Gly-Pro-Arg-pNA значения K_m и V_{max} составили

Таблица 1. Субстратная специфичность протеиназы – активатора прекалликреина *A. terreus* 2

Хромогенный субстрат	Амидолитическая активность, E/A ₂₈₀ × 10 ⁻³
Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	98.0
pGlu-Pro-Arg-pNA	2.2
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	5.0
pGlu-Gly-Arg-pNA	4.4
Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA	2.9
Ac-Leu-Gly-Arg-pNA	3.3
Bz-Ile-Glu(γ-OR)-Gly-Arg-pNA	0
Bz-Arg-pNA	6.6
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	55.8
Z-Ala-Ala-Met-Lys-pNA	7.0
Z-Ala-Ala-Phe-Lys-pNA	3.5
For-Ala-Phe-Lys-pNA	8.6
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA	9.1
Z-Ala-Ala-Leu-pNA	6.1
Z-Gly-Gly-Leu-pNA	4.0
pGlu-Ala-Ala-Phe-Leu-pNA	0
Ac-Phe-pNA	4.4
Ac-Leu-Tyr-pNA	0

2.91 ммоль/мл и 4.26 ммоль/мин × мл соответственно.

Значения K_m и V_{max} для протеиназ, образуемых *A. ochraceus* L-1 и *A. terreus* 2 оказались близки. Однако, судя по сравнению величин K_m , скорость реакции протеиназы *A. ochraceus* L-1 ниже по сравнению с протеиназой-активатором из *A. terreus* 2 [20, 21].

По результатам ингибиторного анализа было сделано заключение о принадлежности протеиназы-активатора *A. terreus* 2 к классу сериновых протеаз. Ингибирование активности протеиназы-активатора PMSF в молярном соотношении фермент : ингибитор 1 : 100 составило 86%. Остальные использованные ингибиторы существенного влияния на активность протеиназы не оказывали (табл. 2).

Изучение зависимости активности протеиназы – активатора прекалликреина *A. terreus* 2 от pH показало, что наибольшее значение активности приходилось на значение pH 10 (рис. 4). Из литературы известно, что микромицеты вида *A. terreus* способны образовывать щелочные протеиназы, в том числе, находящие применение в промышленности в качестве компонентов моющих средств [14].

Кроме того, фермент при pH 10 был и наиболее стабилен (рис. 4). После инкубации при этом pH, протеиназа проявляла высокую тромбиноподобную активность, тогда как при pH 11 активность резко снижалась и составляла после выдерживания в течении 2 ч уже порядка 32% от максимального. Также высокая активность протеиназы-активатора сохранялась после инкубации в растворе с pH 9 (76% от максимальной активности).

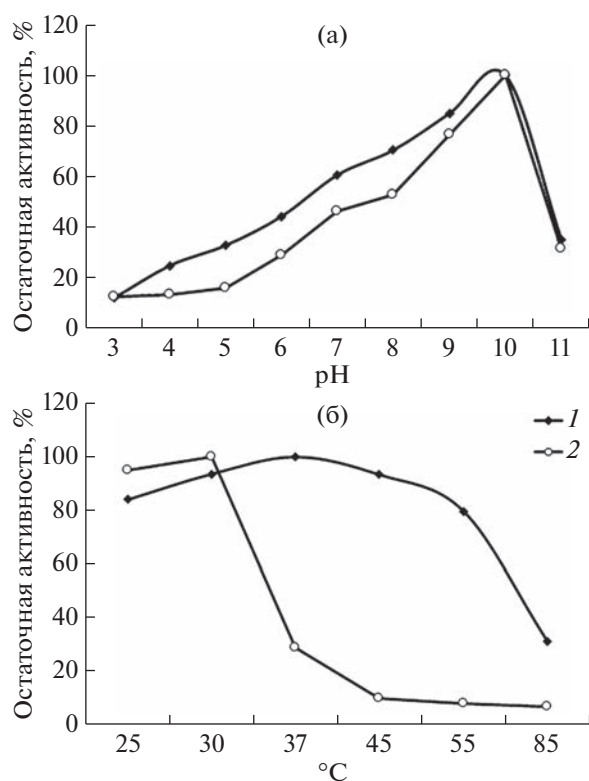
Была установлена оптимальная температура для проявления активности внеклеточной протеиназы *A. terreus* 2 – 37°C, однако протеиназа проявляла активность в широком диапазоне температур: от 25 до 55°C (рис. 5). Активность протеиназы при 65°C снижалась почти в 3 раза по сравнению с максимальным значением активности при 37°C. Эта характеристика протеиназы крайне важна, так как максимум активности соответствовал физиологической температуре человеческого тела, что может быть значимым при разработке диагностического набора на прекалликреин плазмы крови человека с использованием выделенной протеиназы.

Изучение термостабильности протеиназы, показало, что она наиболее стабильна при инкубации при температуре 30°C. Несколько меньшие значения активности протеаза показала при температуре 25°C. После длительной инкубации при температуре от 37°C и выше протеиназа стремительно теряла активность (рис. 4).

Выделенная протеиназа-активатор, образуемая *A. terreus* 2 по ряду свойств, таких как значение pI, гликозилирование и активация прекалликреина, отличалась от близкой протеиназы-активатора, микромицета *A. ochraceus* L-1 (табл. 3). Установлен

Таблица 2. Ингибиторный анализ внеклеточной протеиназы *A. terreus* 2

Ингибитор	Молярное соотношение фермент : ингибитор	Остаточная активность, %
Контроль (без ингибитора)	—	100.0
ЭДТА	1 : 10	99.0
	1 : 100	89.0
<i>o</i> -фенантролин	1 : 10	98.2
	1 : 100	98.7
<i>n</i> -ХМБ	1 : 10	97.5
	1 : 100	92.2
PMSF	1 : 10	6.5
	1 : 100	14.0
Соевый ингибитор трипсина	1 : 10	96.2
	1 : 100	95.8
TLCK	1 : 10	100.0
	1 : 100	100.0
TPCK	1 : 10	100.0
	1 : 100	99.0

**Рис. 4.** Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (1) и стабильность (2) протеиназы – активатора прекалликреина, образуемой *A. terreus* 2.

ные различия позволяют рассматривать протеиназы аспергиллов, способные к реакциям ограниченного протеолиза как новый пул ферментов, имеющих перспективы применения в диагностике при нарушениях системы гемостаза, а именно в качестве экзогенных активаторов с широкой или узкой субстратной специфичностью к проферментам этой системы.

Активатор прекалликреина человека, представляющий собой активированный β -фрагмент фактора Хагемана, интересен тем, что запускает трансформацию прекалликреина в калликреин, а это, в свою очередь, через серию биохимических реакций приводит к синтезу вазоактивного пептида – брадикинина. Поиск экзогенных активаторов этого фактора системы гемостаза может позволить проводить более корректную диагностику ряда заболеваний и делает протеиназу *A. terreus* 2 интересным компонентом таких тест-систем.

Таким образом, протеиназа-активатор прекалликреина плазмы крови человека, выделенная из культуральной жидкости микромицета *A. terreus* 2, представляет собой сериновую гликозилированную протеиназу с молекулярной массой ~34 кДа и оптимумом pH для проявления активности 10.0 и оптимумом температуры 37°C. По ряду свойств данная протеиназа сходна с протеиназой-активатором протеина С, образуемой микромицетом *A. ochraceus* L-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ № СП-3906.2021.4.

Таблица 3. Сравнение свойств протеиназ-активаторов, *A. terreus* 2 и *A. ochraceus* L-1

Свойство	Протеиназа <i>A. terreus</i> 2	Протеиназа <i>A. ochraceus</i> L-1 [12, 21]
Тромбиноподобная активность с Tos-Gly-Pro-Arg-pNA	+	+
Плазминоподобная активность с H-D-Val-Leu-Lys-pNA	+	+
Расщепление H-D-Pro-Phe-Arg-pNA вследствие активации прекалликреина	+	–
Расщепление pGlu-Pro-Arg-pNA вследствие активации протеина С	–	+
Расщепление Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA вследствие активации фактора X	–	+
Спектр расщепляемых хромогенных пептидных субстратов с остатками Arg/Lys в положении P ₁	Широкий	Узкий
K _m (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), ммоль	2.9	2.3
Молекулярная масса, кДа	37	33
Изоэлектрическая точка	4.6	6.0
Оптимум pH активности	10.0	8.0–9.0
Гликозилирование	+	–
Класс протеиназы	Сериновая	Сериновая

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Успехи современной биологии. 2021. Т. 141. № 5. С. 467–482.
2. Sharma C., Osmolovskiy A., Singh R. // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 11. А. 1880. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>
3. Diwan D., Usmani Z., Sharma M., Nelson J.W., Thakur V.K., Christie G., Molina G., Gupta V.K. // *Int. J. Molec. Sci.* 2021. V. 22. № 19. А. 10468. <https://doi.org/10.3390/ijms221910468>
4. Chung D., Yu W.-J., Lim J.-Y., Kang N.-S., Kwon Y.-M., Choi G., Bae S.-S., Cho K., Lee D.-S. // *Microorganisms*. 2022. V. 10. № 1. А. 29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010029>
5. Лукьянова А.А., Корниенко Е.И., Виган П.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Осмоловский А.А. // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2020. Т. 75. № 1. С. 37–42.
6. Осмоловский А.А., Шаш Б., Александрова А.В., Баранова Н.А., Крейер В.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2022. Т. 77. № 2. С. 138–144.
7. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биол. 2018. Т. 73. № 1. С. 47–51.
8. Waheed H., Moin S.F., Choudhary M.I. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 17. Р. 1874–1891.
9. Osmolovskiy A.A., Schmidt L., Orekhova A.V., Komarevtsev S.K., Kreyer V.G., Shabunin S.V., Egorov N.S. // *Life*. 2021. V. 11. А. 782. <https://doi.org/10.3390/life11080782>
10. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
11. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
12. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Биоорганическая химия. 2015. Т. 41. № 5. С. 559–564.
13. Звонарева Е.С., Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 195–200.
14. Chakrabarti S.K., Matsumura N., Ranu R.S. // *Curr. Microbiol.* 2000. V. 40. № 4. Р. 239–244.
15. Biaggio R.T., Silva R.R., Rosa N.G., Leite R.S., Arantes E.C., Cabral T.P., Juliano M.A., Juliano L., Cabral H. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2016. V. 46. № 3. Р. 298–304.
16. de Lima E.E., Franco D.G., Galeano R.M.S., Guimarães N.C.A., Masui D.C., Giannesi G.C., Zanoelo F.F. // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2021. V. 51. № 4. Р. 320–330.
17. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Котова И.Б., Егоров Н.С. // Микология и фитопатология. 2021. Т. 55. № 3. С. 225–228.
18. Батомункуева Б.П., Егоров Н.С. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
19. Gertler A., Trop M. // *Eur. J. Biochem.* 1971. V. 19. № 1. Р. 90–96.
20. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
21. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 373–379.

**Properties of Extracellular Proteinase – Activator of Blood Plasma
Prekallikrein Produced by Micromycetes *Aspergillus terreus* 2**

E. S. Zvonareva^a, A. A. Osmolovskiy^{a, *}, N. A. Baranova^a, I. B. Kotova^a, and V. G. Kreyer^a

^a*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^{*}*e-mail: aosmol@mail.ru*

The extracellular proteinase – activator of human plasma prekallikrein was isolated from the culture fluid of the micromycete *A. terreus* 2, and their physicochemical, kinetic and biochemical properties were studied. It has been established that *A. terreus* 2 extracellular proteinase is a glycosylated serine proteinase with an isoelectric point of 4.6, molecular weight about 37 kDa and the optimum activity at pH 10.0 and a temperature of 37°C. In a number of properties, this proteinase is similar to proteinase – activator of protein C, which is produced by the micromycete *A. ochraceus* L-1.

Keywords: prekallikrein activators, micromycete proteinases, preparative isoelectric focusing, *Aspergillus terreus*

УДК 615.322:582.284:579.2

ПРОДУКЦИЯ МЕЛАНИНА ГРИБОМ *Inonotus obliquus* F-1375 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В ЖИДКОЙ СРЕДЕ И ЕГО АНТИРЕТРОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА

© 2023 г. Т. В. Теплякова¹, *, Н. А. Маркович¹, **, Н. М. Гашникова¹, М. П. Гашникова¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Кольцово
Новосибирской области, 630559 Россия

*e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

**e-mail: namark@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.02.2023 г.

После доработки 20.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Исследовано влияние на продукцию меланина новым штаммом гриба *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat (*Basidiomycota*) F-1375 в глюкозо-триптонной среде добавления препаратов бетулина и тирозина при электрическом освещении и в темноте. Препарат бетулина в исследуемых концентрациях практически не влиял на продукцию меланина, тогда как высокие концентрации тирозина стимулировали образование меланина как в условиях освещения, так и в темноте. Все изученные образцы меланина гриба имели низкую токсичность для культуры клеток МТ-4: как выделенные из природного сырья ($TC_{50} = 96 \pm 8$ мкг/мл), так и при культивировании гриба в жидкой среде с добавлением бетулина и тирозина (TC_{50} от 164 до 400 мкг/мл). Препараты меланина были активны против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в культуре клеток МТ-4, подавляли синтез р24 антигена ВИЧ-1 по результатам ИФА, индекс селективности варьировал от 17 до 192. Наиболее высоким индексом селективности обладал меланин, выделенный из культивированного на свету гриба в присутствии 10 и 20 мМ тирозина (192). Индексы селективности изученных препаратов меланина культивируемого гриба в отношении ВИЧ-1 субтипа А были на уровне 33–192, что позволяло рекомендовать их для разработки противовирусных средств.

Ключевые слова: *Basidiomycota*, *Inonotus obliquus*, антиретровирусный, ВИЧ-1, культивирование в жидкой среде, меланин, мицелий, чага

DOI: 10.31857/S0555109923040165, EDN: QZR DYO

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), распространённый по всему миру, вызывает синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД). В настоящее время около 38.4 миллиона человек живут с ВИЧ, в 2021 г. вновь заразилось 1.5 млн человек, что делает ВИЧ серьёзной угрозой для здоровья населения (HIV gov. Global statistics, <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics>, 2022). В дополнение к химически синтезированным антиретровирусным препаратам возник интерес к противовирусным природным соединениям.

Так, было показано, что тритерпены гриба *Ganoderma lucidum* ингибируют протеазу ВИЧ-1 и цитопатические эффекты, индуцированные ВИЧ-1, в клетках МТ-4 [1]. Другие вещества против ВИЧ-1, такие как ганодериол F, ганодерманонтриол и ганодеровая кислота В из *G. lucidum*, лентинан из *Lentinus edodes*, велютин из *Flammulina velutipes*, лакказа из *Volvariella volvacea*, *n*-гидроксibenзой-

ная кислота, *n*-кумариновая кислота и коричная кислота из *Pleurotus sajor-caju* также проявляли активность против протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1 [2–4]. Из *G. colossum* были выделены ланостановые тритерпеноиды шизанлактон А, колосолактон Е, колосолактон V и колосолактон VII, активные в отношении протеазы ВИЧ-1 со значениями IC_{50} от 5.0 до 13.8 пг/мл [5–7].

Меланизированные макроскопические грибы привлекают все большее внимание. Одним из таких грибов является лекарственный гриб *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat (*Basidiomycota*), также называемый чага. Этот гриб растёт в основном на берёзах и широко распространён в северных широтах Европы, Азии и Северной Америки.

После разносторонних клинических и биохимических исследований гриб *I. obliquus* был разрешён Фармакологическим комитетом Министерства здравоохранения СССР в 1955 г. к использованию в медицине. Одним из активных

компонентов аптечного сырья и склероция чаги является пигмент меланин, обладающий фото- и радиопротекторным, антиоксидантным и генопротекторным свойствами [8–10], противовирусной и противоопухолевой активностью [11].

Показана эффективность меланина природной чаги *I. obliquus* в отношении подавления вирусов гриппа, вируса простого герпеса 2 типа, вируса осповакцины, вируса иммунодефицита человека [12]. Установлено ингибирование репликации коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром COVID-19, при профилактическом введении меланина в культуру клеток *Vero* [13].

Из культивируемых грибов *I. obliquus* показал себя лучшим продуцентом меланинов среди трутовых грибов согласно исследованиям белорусских ученых [14], причем индекс селективности у меланина культивируемого гриба *I. obliquus* в отношении вируса гриппа A/H1N1pdm09н в 2.5 раза выше по сравнению с меланином природной чаги [15]. Противовирусная эффективность соединений меланина культивируемого гриба была установлена в профилактическом (за 2 ч до инфицирования клеток) и в терапевтическом режиме введения лекарств как для ВИЧ-1, так и для вируса герпеса HSV-1 [16].

В связи с актуальностью получения меланина из культивируемого березового гриба для разработки лекарственных препаратов важным шагом является оптимизация такого культивирования с целью повышения выхода биомассы, содержащей активные в отношении ингибирования вирусных компоненты.

Цель исследования – стимуляция накопления биомассы мицелия и продукции меланина при культивировании нового штамма *I. obliquus* F-1375 в жидкой среде и оценка полученных образцов меланина в отношении подавления репродукции ВИЧ-1.

МЕТОДИКА

Материалы и реактивы. Для работы использовали следующие реактивы: глюкоза, K_2HPO_4 ; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, квалификации “ч. д. а.”, KH_2PO_4 квалификации “х. ч.”, агар-агар и триптон (Vacto™ agar, Vacto™ Tryptone, “BO Becton, Dickinson and Company”, Франция), дрожжевой экстракт (“BO Becton, Dickinson and Company”, Бельгия). В качестве добавок в среду для культивирования вносили либо экстрагированный изопропиловым спиртом бетулин (содержание не менее 85%) производства ООО “Сады Алтая Агро” (Россия), либо химически чистый L-Tyrosine (“Vega Biochem, Tucson”, США). Использовали дистиллированную и деионизованную воду.

Глюкозо-триптонная среда (ГТС), которая была использована для выращивания гриба, имела

следующий состав (г/л): глюкоза – 30; триптон – 10.0; дрожжевой экстракт – 5.0; KH_2PO_4 – 1.1; $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ – 4.4; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0.25; вода – 1 л, pH 7–8. Агаризованную среду готовили на основе ГТС с добавлением 20 г агар-агара на 1 л раствора [11].

Культивирование гриба. В работе использовали штамм базидиального гриба *I. obliquus* F-1375, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (Новосибирская обл., Россия).

Первый этап культивирования проводили на чашках Петри, затем в стационарных условиях в 50 мл ГТС во флаконах объемом 500 мл. Из колоний в чашках Петри стерильным пробочным сверлом диаметром 5 мм вырезали блоки и вносили по 1 шт. во флаконы с 50 мл жидкой среды ГТС. В среду ГТС вносили в качестве добавки либо бетулин в виде спиртового 10%-ного раствора в 96°-ном этиловом спирте до концентраций 2 и 5 мг/л (4.5 и 11.2 мкМ), либо тирозин (L-Tyr) до конечной его концентрации в среде 2, 10 и 20 мМ.

Получение меланина. Гриб выращивали в течение 69 сут: 9 сут – в чашках Петри при комнатной температуре, 48 сут культивировали во флаконах при электрическом освещении и комнатной температуре, затем хранили в бытовом холодильнике и выделяли меланин. Кроме того, культивирование во флаконах проводили в течение 60 сут в темноте, а затем хранили в бытовом холодильнике и выделяли меланин.

Выделение меланина из культуральной жидкости. Содержимое флаконов фильтровали последовательно через капроновый и бумажный фильтры, определяли объем, pH и оптическую плотность (ОП) фильтратов при длине волны 465 нм.

Полученную культуральную жидкость (КЖ) подкисляли до pH 1.5–2.0, центрифугировали при 3200 g 10 мин в центрифуге Centra CL3 (“Thermo IEC”, США). Надосадочную жидкость отбрасывали, осадок растворяли в 0.1 М NaOH, доводили до pH 1.5–2.0 и снова центрифугировали. Осаждение повторяли трижды, затем осадок промывали дважды 0.1 н HCl с последующим центрифугированием. Очищенный осадок растворяли в деионизованной воде, доводили pH до 7.0–8.0 и сушили в предварительно взвешенных стеклянных чашках Петри при 30°C в сушильном шкафу ШС-80-01 СПУ производства ОАО “Смоленское специализированное конструкторско-технологическое бюро систем программного управления”, (Россия) в течение ночи. Чашку Петри взвешивали на весах OHAUS Pioneer PA64 (США).

Выделение меланина из мицелия. Мицелий отделяли от КЖ на капроновом фильтре, взвешивали на весах “SHINKO AJH” (Япония), измельчали скальпелем и добавляли 2%-ную NaOH в соотношении 1 : 10. Гидролиз биомассы мицелия прово-

дили в 2%-ной NaOH в течение 3 ч в водяной бане при 100°C.

Для проверки принадлежности выделенных пигментов к меланинам проводили три качественных теста на присутствие в них хиноидных и фенольных структур. Для проведения качественных реакций к 5 мл 0.1%-ного раствора пигмента в 0.1 М NaOH добавляли 0.5 мл 10%-ной H₂O₂ (положительная реакция – обесцвечивание раствора) или 0.1 мл 0.1 М KMnO₄ (положительная реакция – раствор зеленеет). При дополнительном внесении 0.5 мл 0.1 М KMnO₄ раствор обесцвечивался, а в осадок выпадали коричневые хлопья. Кроме того, использовали добавление 0.1 мл 5%-ного раствора FeCl₃, в этом случае при положительной реакции образовывались крупные коричневые хлопья, при этом в растворе с избытком хлорида железа осадок растворялся.

Спектры 0.01%-ных препаратов меланина при 240–700 нм регистрировали на цифровом спектрофотометре UV5Nano производства “Mettler Toledo” (Швейцария).

Анализ противовирусной активности меланина в отношении ВИЧ-1. В качестве чувствительных к ВИЧ-1 клеток использовали лимфоидную культуру клеток человека MT-4, полученную из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. Клетки MT-4 культивировали на среде RPMI-1640 (“Gibco”, США) с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 20 мкг/мл гентамицина. В работе использовали лабораторный штамм ВИЧ-1 субтипа А (при репродукции на MT-4 вызывает 100%-ную гибель клеток) из лабораторной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора. Определение токсичности исследуемых препаратов проводили методом МТТ в 96-луночном планшете. В лунки планшета вносили по 40000 клеток MT-4 в 100 мкл полной среды RPMI-1640 (“Gibco”). Исследовали препараты с начальной концентрацией меланина 500 мкг/мл с шагом разведения два, по 3 повторности для каждого разведения препарата. По результату тестирования токсичности препаратов для культуры клеток MT-4 определяли для каждого препарата TC₅₀ (концентрация, при которой жизнеспособными остаются 50% клеток).

Клетки инфицировали постоянной дозой вируса, соответствующей 300 CCID₅₀ (50% инфекционная доза вируса, определенная титр-методом Рида–Менча). Инкубирование клеток MT-4 с исследуемыми разведениями препарата и вирусом проводили 5 сут в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5%-ном CO₂. Исследование способности препаратов ингибировать размножение ВИЧ-1 проводили с начальной концентрации, равной TC₅₀. На первом этапе подавление репродукции ВИЧ исследуемыми препаратами оцени-

вали в 96-луночном планшете путем определения изменения концентрации живых клеток MT-4, инфицированных ВИЧ-1. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности превращения ими растворимого МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) в кристаллы формазана [17]. После растворения кристаллов в изопропанолe интенсивность синего окрашивания измеряли с помощью спектрофотометра (“ThermoFisherScientific”, США) на двух длинах волн – 540 и 690 нм. Дополнительно определяли способность препарата блокировать размножение ВИЧ по степени снижения репродукции вирусного белка p24 в культуральной жидкости. Пробы культуральной жидкости для количественного исследования белка p24 методом ИФА отбирались на 5 сут инкубации. Для количественного определения белка p24 ВИЧ-1 использовали иммуноферментные наборы ВектоВИЧ-1 p24-антиген-подтверждающий тест производства ЗАО “Вектор-Бест” (Россия).

Обработка результатов. Учет и обработку полученных результатов проводили с помощью специальной программы SoftMax Pro 4.0. Достоверность результатов оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента MS Excel 2010. Уровень значимости (α) был ≤ 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние тирозина и бетулина на накопление меланина культурой *I. inonotus* F-1375. Добавление к среде препарата бетулина чаги (возможного фактора синтеза меланина) в концентрации 4.5 и 11.2 мкМ несколько повышало (~в 1.3 раза) общую массу меланина при культивировании *I. obliquus* при электрическом освещении. Добавление L-Туг в концентрации 2 мМ повышало выход меланина на 40%, а его концентрации 10 мМ и 20 мМ приводили к двукратному увеличению выхода меланина по сравнению с контролем (табл. 1).

Внесение препарата бетулина увеличивало выход меланина в 2.3 раза по сравнению со средой ГТС без добавок через 60 сут инкубации в темноте, в то время как препарат L-Туг увеличивал общую массу меланина культуры в два (2 мМ), 3.7 (10 мМ) и 4.6 раза (20 мМ) (табл. 2).

Дальнейшие исследования проводили со следующими образцами меланина: образец № 21-13 – меланин из природной чаги *I. obliquus* (экстракция 2%-ным NaOH в автоклаве в течение 30 мин при избыточном давлении 0.5–0.7 атм.). Образец № 21-36 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина на свету, образец № 21-37 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина, выращенного в темноте, № 21-38 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 10 и 20 мМ L-Туг, выращенного в темноте, № 21-39 –

Таблица 1. Количество меланина в КЖ и мицелии *I. obliquus* штамм F-1375 на свету после инкубации в глубинных условиях в среде ГТС в течение 48 сут при 25–26°C

Добавка к ГТС	Масса внеклеточного меланина, г/л	Масса меланина мицелия, г/л	Общая масса меланина, г/л	Увеличение общей массы меланина по сравнению с контролем
Без добавок	0.10	0.58	0.68	1.0
Бетулин, 4.5 мкМ	0.21	0.72	0.93	1.4
Бетулин, 11.2 мкМ	0.20	0.62	0.82	1.2
2 мМ L-Тур	0.33	0.65	0.98	1.4
10 мМ L-Тур	0.63	0.77	1.41	2.1
20 мМ L-Тур	0.55	0.81	1.36	2.0

Таблица 2. Количество меланина в КЖ и мицелии *I. obliquus* штамма F-1375 в темноте после инкубации в глубинных условиях на среде ГТС в течение 60 сут при 25–26°C

Добавка к ГТС	Масса внеклеточного меланина, г/л	Масса меланина мицелия, г/л	Общая масса меланина, г/л	Повышение общей массы меланина по сравнению с контролем
Без добавок	0.38	0.08	0.46	1.0
Бетулин, 4.5 мкМ	0.28	0.8	1.08	2.3
Бетулин, 11.2 мкМ	0.34	0.74	1.08	2.3
2 мМ L-Тур	0.38	0.56	0.94	2.0
10 мМ L-Тур	0.73	0.95	1.68	3.7
20 мМ L-Тур	1.12	1	2.12	4.6

меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 10 и 20 мМ L-Тур на свету.

Спектры и соотношение оптических плотностей в ультрафиолетовом и видимом свете, а также выход меланина отличались у препаратов из природной чаги и из культуры гриба в среде ГТС в присутствии в качестве эффекторов бетулина и тирозина (рис. 1, табл. 3). Аналогичные различия спектров меланина из природной и культивируемой чаги были описаны и ранее [11, 18, 19], что позволило предположить, что исследуемые препараты содержали меланины разного типа: меланин

из природной чаги относят к алломеланинам, а полученный из культуры гриба – к эумеланинам.

В связи с истощением природных источников *I. obliquus* (чага) широкое распространение получило культивирование выделенных из нее штаммов твердофазным или глубинным способами в лабораторных и заводских условиях для создания лекарственных препаратов на их основе. Однако физико-химические свойства пигментов пирока-техинового типа, меланинов, образуемых *I. obliquus* в природных условиях и искусственной культуре, такие как элементный состав, функциональные группы, спектральные и парамагнитные свойства,

Таблица 3. Оптическая плотность при 240 и 465 нм 0.01%-ных препаратов меланина природного и полученного в результате культивирования штамма *I. obliquus* F-1375

Показатель	Препараты меланина из природной и культивируемой чаги*				
	21–13	21–36	21–37	21–38	21–39
ОП ₂₄₀	3.618	1.546	1.876	2.403	2.109
ОП ₄₆₅	0.556	0.295	0.386	0.583	0.474
ОП ₂₄₀ /ОП ₄₆₅	6.51	5.24	4.86	4.12	4.44
Выход, %	32.36	0.088	0.108	0.190	0.138

* Обозначения как на рис. 1.

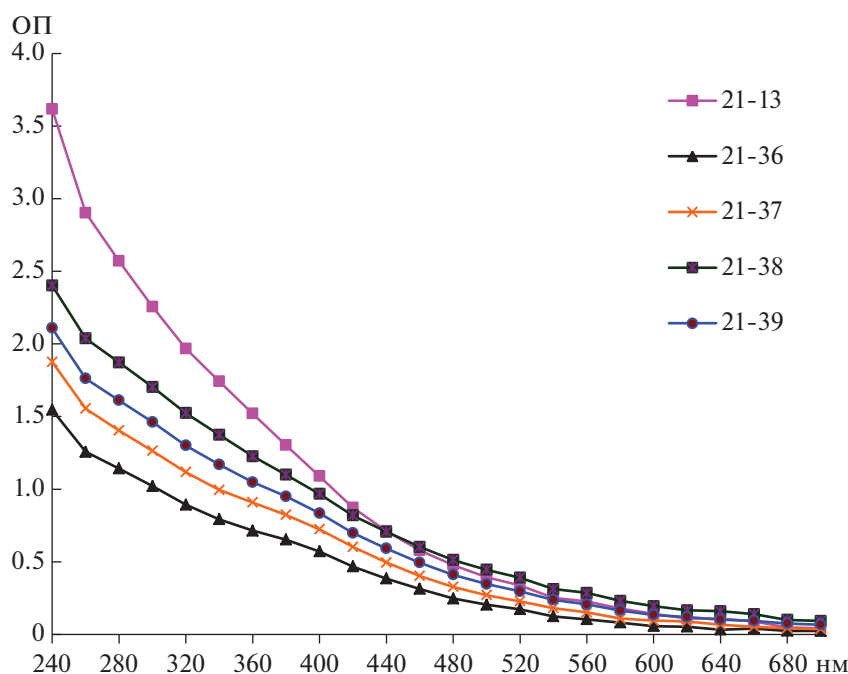


Рис. 1. Спектры 0.01%-ных препаратов меланина природного и полученного из культуры штамма F-1375 *I. obliquus*, выращенного в жидкой среде: 21-13 – меланин из природной чаги; 21-36 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина на свету, 21-37 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 4.5 и 11.2 мкМ бетулина, выращенного в темноте, 21-38 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375 с добавлением 10 и 20 мМ L-Тур, выращенного в темноте, 21-39 – меланин из штамма *I. obliquus* F-1375, выращенного с добавлением 10 и 20 мМ L-Тур на свету.

особенности термодеструкции свидетельствовали о структурных различиях между пигментами, что и позволило отнести их к разным видам [18–20].

Исследование токсичности для клеток человека МТ-4 и анализ антиретровирусной активности полученных образцов меланина. Цитотоксичность препаратов меланина оценивали по их влиянию на лимфоидные клетки человека культуры МТ-4. После пяти дней культивирования клеток с добавлением в питательную среду разных концентраций препаратов меланина было показано, что токсич-

ность меланина варьировала от 96 до 400 мкг/мл. Антиретровирусная активность, определяемая двумя различными методами, была выявлена для всех исследуемых препаратов меланина. В табл. 4 представлены данные по активности образцов меланина в отношении ВИЧ-1.

Исследование препаратов показало, что минимальной токсичностью и противовирусной активностью обладал меланин, выделенный щелочной экстракцией из природной чаги.

Таблица 4. Оценка противовирусной активности препаратов меланина в отношении ВИЧ-1 и токсичности для клеток МТ-4

Исследуемый параметр	Препараты меланина из природной и культивированной чаги, шифр препарата**				
	21-13	21-36	21-37	21-38	21-39
Цитотоксичность (TC ₅₀ , мкг/мл)	96 ± 8	400 ± 24	272 ± 18	164 ± 12	250 ± 12
Противовирусная активность (IC ₅₀ , метод МТТ, мкг/мл)	4.3 ± 0.6	3.0 ± 0.9	4.1 ± 1.0	4.0 ± 1.2	1.0 ± 0.6
Противовирусная активность (IC ₅₀ , метод ИФА, мкг/мл)	5.6 ± 1.0	10.5 ± 1.3	6.4 ± 0.6	5.0 ± 0.8	1.3 ± 0.3
Индекс селективности (SI = TC ₅₀ /IC ₅₀)*	17	38	43	33	192

* Индекс селективности (SI = TC₅₀/IC₅₀), где TC₅₀ – 50%-ная токсическая концентрация, IC₅₀ – 50%-ная ингибирующая концентрация. ** Обозначения как на рис. 1.

Меланин, выделенный из гриба, культивируемого на свету с добавлением тирозина, обладал наибольшей противовирусной активностью, подавляя репродукцию ВИЧ-1 в клетках человека. Этот препарат имел также средние характеристики по цитотоксичности, а его индекс селективности составил 192 и был выше аналогичных показателей других изучаемых меланинов в 4–11 раз. При расчете показателя отношения $ТС_{50}/IC_{50}$ использовали данные по концентрации меланина, способной блокировать репродукцию ВИЧ-1, полученные методом ИФА, так как этот метод позволяет выполнить количественную оценку концентрации вирусного белка, присутствующего в культуральной жидкости при культивировании инфицированных ВИЧ-1 клеток МТ-4.

Ранее были предложены несколько способов интенсификации продукции биомассы и меланина при культивировании: с помощью света низкой интенсивности [21], укрывания колб черной бумагой, которое повышало выход биомассы через 10 сут до 12.9 г/л в темноте, по сравнению с контролем 11.8 г/л при дневном свете [22], добавление ионов меди и тирозина [18].

Кроме того, рост мицелия и синтез меланинов в глубинных условиях в культуре гриба увеличивали окислительным стрессом, индуцируемым постоянным добавлением пероксида водорода [23], в результате кратковременного воздействия на вегетативный мицелий когерентного синего света низкой интенсивности [21], добавлением к культуре *I. obliquus* коллоидных наночастиц металлов Ag и Mg [24].

По полученным результатам добавление в ГТС L-Туг в концентрациях 2, 10 и 20 мМ повышало при культивировании выход меланина как в темноте, так и при электрическом освещении (табл. 1, 2). По-видимому, влияние на синтез меланина происходило через тирозиназу грибов (КФ1.14.18.1), катализирующую окисление L-Туг до 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОРА) и окисление ДОРА до допахинона [19, 21, 25]. При анализе тирозиназы гриба бетулин являлся неконкурентным ингибитором активности этого фермента с $K_i = 0.4$ мкМ, показывая IC_{50} 5.13 мкМ [26]. Однако сравнимые с ингибирующими концентрации препарата бетулина (4.5 и 11.2 мкМ) в настоящей работе не снижали выход меланина при культивировании ни при электрическом свете, ни в темноте, что связано скорее всего с различием препаратов и различием систем анализа (табл. 1, 2). Общий выход меланина в жидкой среде без эффекторов зависел от условий и продолжительности культивирования *I. obliquus* F-1375 : 0.68 г/л на свету и 0.46 г/л в темноте без встряхивания (табл. 1, 2).

В опытах концентрации тирозина 10 и 20 мМ практически одинаково стимулировали меланогенез в темноте (табл. 2), тогда как при культиви-

ровании с электрическим освещением меланогенез был выше при более высокой концентрации тирозина (табл. 1), что совпадало с результатами Бабицкой с соавт. [18], полученными при обычном освещении.

Меланин, полученный из природного лекарственного гриба чаги *I. obliquus*, а также выделенный из мицелия и КЖ глубинной культуры гриба, может быть перспективен в качестве компонента антиретровирусного препарата, а также других лекарственных препаратов. Однако частично его активность могла быть обусловлена присутствием в препаратах меланина терпеновых соединений [8, 27].

Необходимы дальнейшие исследования по безопасности и эффективности меланина и других биологически активных веществ природной и культивируемой чаги (*I. obliquus*) в доклинических и клинических исследованиях.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

Список литературы

1. El-Mekawy S., Meselhy M.R., Nakamura N., Tezuka Y., Hattori M., Kakiuchi N., Shimotohno K., Kawahata T., Otake T. // *Phytochem.* 1998. V. 49. № 6. P. 1651–1657. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(98\)00254-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(98)00254-4)
2. Choengpanya K., Ratanabunyong S., Seetaha S., Tabtimmai L., Choowongkamon K. // *Saudi J. Biol. Sci.* 2021. V. 28. № 5. P. 2807–2815. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.012>
3. Duru K.C., Kovaleva E.G., Danilova I.G., van der Bijl P. // *Phytother. Res.* 2019. V. 33. № 8. P. 1966–1980. <https://doi.org/10.1002/ptr.6384>
4. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Julich W.D. // *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2005. V. 2. № 3. P. 285–299. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh107>
5. Duru M.E., Çayan G.T. // *Rec. Nat. Prod.* 2015. V. 9. № 4. P. 456–483.
6. El Dine R.S., El Halawany A.M., Ma C.M., Hattori M. // *J. Nat. Prod.* 2008. V. 71. № 6. P. 1022–1026. <https://doi.org/10.1021/np8001139>
7. El Dine R.S., El Halawany A.M., Nakamura N., Ma Ch.-M., Hattori M. // *Chem. Pharm. Bull.* 2008. V. 56. № 5. P. 642–646. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.642>
8. Burmasova M.A., Utebaeva A.A., Sysoeva E.V., Sysoeva M.A. // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 6. P. 248. <https://doi.org/10.3390/biom9060248>
9. Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. // *Успехи медицинской микологии.* 2005. Т. 6. С. 255–259.
10. Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Курченко В.П., Иконникова Н.В., Кукулянская Т.А. // *Прикл. биохимия микробиология.* 2000. Т. 36. № 5. С. 569–574.

11. Патент РФ. 2020. № 2716590.
12. Патент РФ. 2013. № 2480227 С2.
13. Патент РФ. 2021. № 2747018.
14. Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Иконникова Н.В., Бисько Н.А. // Успехи медицинской микологии. 2005. Т. 6. С. 263–265.
15. Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Олькин С.Е., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В. // Химия растительного сырья. 2020. № 2. С. 283–289. <https://doi.org/10.14258/JCPRM>
16. Носик Д.Н., Носик Н.Н., Теплякова Т.В., Лобач О.А., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г., Бочкова М.С., Ананько Г.Г. // Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65. № 5. С. 276–283. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-4>
17. Rannecouque C., Daelemans D., De Clercq E. // Nat. Protoc. 2008. V. 3. № 3. P. 427–434. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.517>
18. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В. // Прикл. биохимия микробиология. 2000. Т. 36. №4. С. 439–444.
19. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г. // Прикл. биохимия микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 68–72.
20. Бабицкая В.Г., Щерба В.В. // Прикл. биохимия микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 286–291.
21. Poyedinok N., Mykhaylova O., Tugay T., Tugay A., Negriyko A., Dudka I. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. V. 176. № 2. P. 333–343. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1577-3>
22. Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Miao K., Jiang H. // Biore-source Technol. 2009. V. 100. № 19. P. 4481–4487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.027>
23. Zheng W., Zhao Y., Zhang M., Wei Z., Miao K., Sun W. // Med Mycol. 2009. V. 47. № 8. P. 814–823. <https://doi.org/10.3109/13693780802653933>
24. Poyedinok N., Mykhaylova O., Sergiichuk N., Tugay T., Tugay A., Lopatko S., Matvieieva N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2020. V. 191. № 3. P. 1315–1325. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03281-2>
25. Chen Q.-X., Song K.-K., Qiu L., Liu X.-D., Huang H., Guo H.-Y. // Food Chem. 2005. V. 91. № 2. P. 269–274. <https://doi.org/10.1080/14756360310001613094>
26. Yan Z.-F., Yang Y., Tian F.-H., Mao X.-X., Li Y., Li C.-T. // Evid. Based Complement Alternat. Med. 2014. 2014:259836. <https://doi.org/10.1155/2014/259836>
27. Бурмасова М.А., Сысоева М.А. // Хим.-фарм. журн. 2017. Т. 51. № 4. С. 46–48.

Melanin Production by the Medicinal Mushroom *Inonotus obliquus* F-1375 in Submerged Liquid Cultivation and its Antiretroviral Properties

T. V. Teplyakova^{a, *}, N. A. Markovich^{a, **}, N. M. Gashnikova^a, and M. P. Gashnikova^a

^aState Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”,
Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk Oblast, 630559 Russia

*e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

**e-mail: namark@yandex.ru

We have explored the effect of a new strain of the mushroom *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat (*Basidiomycota*) F-1375 on melanin production in a glucose-tryptone medium, adding the preparation of betulin, chemically pure tyrosine, under electric lighting and under dark conditions. The betulin preparation in the examined concentrations had practically no effect on the production of melanin, while high concentrations of tyrosine stimulated the production of melanin both under illumination and in the dark. All studied samples of mushroom melanin are non-toxic: both isolated from natural (TC₅₀ = 96 ± 8 µg/mL) and cultured in a liquid medium with the addition of betulin and tyrosine (TC₅₀ from 164 to 400 µg/mL); active against HIV-1 in MT-4 cell culture (IC₅₀ 1 to 4.3 µg/mL, SI 17 to 192). The selectivity indices of the learned preparations of melanin of cultivated *Inonotus obliquus* F-1375 against the human immunodeficiency virus subtype A were at the level of 33-192, which makes it possible to recommend them for the development of antiviral agents. Melanin from mushroom *Inonotus obliquus* F-1375 cultured in the electrical light with the addition of 10 and 20 mM tyrosine has the highest selectivity index for retrovirus HIV-1 (SI 192).

Keywords: antiretroviral, *Basidiomycota*, chaga, Human immunodeficiency virus 1, *Inonotus obliquus*, melanin, mycelium, selectivity index, submerged liquid cultivation

УДК 577.112.083

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА rhPDGF-BB, ПОЛУЧЕННОГО В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2023 г. А.-А. В. Мистерова¹ *, В. А. Чичерин¹, А. С. Герасимов¹

¹Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

*e-mail: usr21438@vyatsu.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Рекомбинантный тромбоцитарный фактор роста человека rhPDGF-BB является одним из важнейших цитокинов, одобренных для медицинского использования. Препарат, известный под международным непатентованным названием “бекаплермин”, доказал свою эффективность при лечении нейропатических язв, ожогов и травм периодонта (в сочетании с остеокондуктивной матрицей). В исследовании проанализированы способы выделения и очистки rhPDGF-BB и предложена оптимизированная методика, позволяющая получать высокоочищенный rhPDGF-BB из культуральной жидкости метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* – продуцента rhPDGF-BB. Предложен простой и быстрый метод хроматографической очистки, позволяющий получать rhPDGF-BB чистой >98% согласно электрофорезу в ПААГ, с содержанием хозяйских белков (НСП) 33 ± 4 нг/мг белка. Эффективная концентрация пролиферативной активности выделенного по оптимизированной методике rhPDGF-BB составляла 5.02 ± 2.64 нг/мл, что сопоставимо с коммерчески доступными аналогами. Разработанная методика может быть использована для получения в промышленности.

Ключевые слова: фактор роста тромбоцитов человека, ростовые факторы, *Pichia pastoris*, синдром диабетической стопы, рекомбинантные белки

DOI: 10.31857/S0555109923040098, **EDN:** QZLWNT

Регенеративная медицина считается одним из передовых фронтов развития наук о жизни. Важнейшую роль в ней играет применение ростовых факторов – цитокинов, способствующих пролиферации и дифференцировке различных клеток организма. Фактор роста тромбоцитов PDGF-BB человека входит в большое семейство тромбоцитарных ростовых факторов и является важнейшим универсальным цитокином, обладающим мощным пролиферативным действием на многие клетки человеческого организма – фибробласты, остеобласты, эндотелий кровеносных сосудов и др. [1].

PDGF-BB является единственной одобренной молекулой из семейства PDGF (факторы роста тромбоцитов человека, platelet-derived growth factors) для применения в медицинских целях [2]; его свойства были охарактеризованы как на молекулярном, так и на клеточном уровне, а также в модельных системах *in vivo*. Это делает PDGF-BB привлекательным для разработки средств регенеративной медицины: в их числе препарат Regranex, одобренный FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для лечения синдрома диабе-

тической стопы [3], комбинированный препарат GEM21S для челюстно-лицевой имплантации [4]. Описано применение PDGF-BB в хирургии и для трансплантации тканей опорно-двигательного аппарата [5]. Более того, комплекс ростовых факторов, включающий в себя рекомбинантный PDGF-BB, может быть более безопасной альтернативой фетальным сывороткам, используемым для культивирования стволовых клеток *ex vivo* при разработке клеточных продуктов и проведении доклинических исследований [6]. Таким образом, к рекомбинантному PDGF-BB человека (rhPDGF-BB) проявляется большой интерес. При этом, ни один из известных препаратов на основе rhPDGF-BB не зарегистрирован в России, из чего можно сделать вывод о том, что регенеративные продукты на основе rhPDGF-BB недоступны для российских пациентов.

Ввиду того, что молекула PDGF-BB представляет собой гомодимерный гликопротеин сложной структуры, имеющий массу 25 кДа и 8 дисульфидных связей [7], для получения его рекомбинантного аналога рационально использовать клетки дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia*



Рис. 1. Примеры основных методов выделения и очистки rhPDGF-BB, предложенных в литературе, начиная с 1988 г. 1 – [1], 2 – [2], 3 – [3].

pastoris. При этом низкий выход rhPDGF-BB в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* подразумевает высокие производственные затраты [8]. В вопросах выделения и очистки rhPDGF-BB мнения расходятся. Ниже приведены несколько предложенных в литературе вариантов схем выделения и очистки (рис. 1), при этом вариант Кунитани с соавт. [9] является запатентованным способом очистки rhPDGF-BB с целью получения лекарственных средств для регенеративной медицины.

Согласно современной концепции “Quality by Design”, использование методов хроматографической очистки в логической последовательности увеличивает эффективность очистки, при этом снижая число необходимых этапов очистки и производственные расходы. Комбинируя ортогональные хроматографические методики, возможно добиться эффективного удаления различных типов примесей на каждой стадии, и достижения чистоты полученной субстанции, удовлетворяющей высоким требованиям безопасности и эффективности. Если рассматривать эти факторы еще на стадии разработки технологии, то возможно получить гораздо более устойчивый, контролируемый процесс, обеспечивающий высокие выходы продукта.

Известно, что стадии гель-фильтрации и гидрофобной хроматографии являются одними из наиболее трудоемких и длительных методов хроматографической очистки, а метод диализа практически не адаптируется под промышленные нужды ввиду его длительности и необходимости использования больших объемов буферных растворов. Таким образом, существует реальный потенциал для оптимизации методики получения rhPDGF-BB из культуральной жидкости дрожжевых продуцентов. Более простая схема выделения и очистки может стать основой оптимального техно-

логического решения для возможного промышленного производства rhPDGF-BB в России.

Цель работы – оптимизировать методику выделения и очистки из культуральной жидкости *P. pastoris* для получения rhPDGF-BB высокого качества.

МЕТОДИКА

Для всех экспериментов использовались реактивы высокого качества марки “Для анализа” (“Sigma-Aldrich”, США), если не указано иное. Для целей генной инженерии использовались ферменты производства “Thermo Fisher Scientific” (США).

Получение продуцента rhPDGF-BB. Продуцент *P. pastoris* штамм X33 (“Invitrogen”, США), экспрессирующий рекомбинантный ген hPDGF-B (GenBank ID: 5155) человека под промотором AOX1, был получен с использованием экспрессионного вектора pVR2Xba, который является аналогом коммерческого вектора pPICZα (“Invitrogen”, США) и содержит ген устойчивости к зеоцину. Вектор любезно предоставлен А.С. Герасимовым. Ген hPDGF-B (кДНК) получали методом кросс-ПЦР в 2 стадии из синтетических олигонуклеотидов (синтезирован в ЗАО “Евроген”, Россия). Полученный ПЦР-продукт клонировали в экспрессионный вектор pVR2Xba при помощи T4 ДНК-лигазы по сайтам *XhoI/XbaI*. Клетки *P. pastoris* X33 трансформировали полученным экспрессионным вектором методом электропорации [10]. Отбор трансформантов проводился на плотной питательной среде YPD (пептон – 2%, дрожжевой экстракт – 1%, глюкоза – 2%, агар – 1.5%, “Vecton Dickinson”, США), содержащей 100 мкг/мл селективного агента зеоцина. Культура *P. pastoris* продуцента rhPDGF-BB депонирована в коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии Вятского государственного университета.

ПЦР-скрининг. Наличие вставки целевого гена в дрожжевых клетках определяли методом ПЦР-скрининга (размер целевого ПЦР-продукта 1000 п.о.), используя праймеры на промотор (5'-GACTGAAAATCAATTGAC-3') и на целевой ген (3'-TTTCGСАТТТGCACGCCAGG-5'). Определение “дозы гена” проводили одновременным посевом каждого клона на плотную среду YPD, с концентрациями зеоцина 100, 500, 1200 и 2500 мкг/мл.

Анализ уровня экспрессии целевого гена hP-DGF-B. Уровень экспрессии целевого гена анализировали только у высококопийных трансформантов. Отобранные клоны выращивали в 10 мл жидкой питательной среды BMGY (дрожжевой экстракт – 1%, бакто-пептон – 2%, глицерин – 1%, YNB – 1.34%, 100 мМ калий-фосфатного буфер, pH 6.5; 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1 (“Pichia fermentation process guidelines”, Invitrogen, 2002) в пластиковых пробирках объемом 50 мл в течение 48 ч. Клетки собирали центрифугированием (5 мин, 1500×g, 20°C) и суспендировали в 1.5 мл индукционной среды BMMY (дрожжевой экстракт – 1%, бакто-пептон – 2%, метанол – 1%, YNB – 1.34%, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 5.8; 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1). Культивирование проводили в планшетах “System Duetz” (“Kuhner AG”, Швейцария) при тех же условиях в течение 72 ч, добавляя 1% метанола каждые 12 ч. Культуральную жидкость отделяли от биомассы дрожжей центрифугированием (10 мин, 7000×g, 4°C) и анализировали содержание rhPDGF-BB методом электрофореза по Лэммли в 14%-ном ПААГ в невосстанавливающих условиях.

Биосинтез rhPDGF-BB. Продукт выращивали в шейкере-инкубаторе “Kuhner ISFX-1” (“Kuhner AG”, Швейцария). 3 мл суспензии с $OD_{600} \approx 2-6$ о.е. инокулировали в 400 мл среды BMGY (дрожжевой экстракт – 1%, бакто-пептон – 2%, глицерин – 3%, YNB – 1.34%, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 6.5; биотин – 50 мкг/мл, 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1) и выращивали в колбах объемом 2 л до $OD_{600} \approx 10-15$ о.е. Через 48 ч клетки собирали центрифугированием (5 мин, 1500×g, 20°C) и суспендировали по 30 о.е. в 150 мл индукционной среды BMMY (дрожжевой экстракт – 1% (фракция <10 кДа), бакто-пептон – 2%, метанол – 1%, сорбитол – 0.5%; YNB – 1.34%, 120 мМ калий-фосфатного буфера, pH 5.8; биотин – 50 мкг/мл, 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1). Культивировали в колбах на 1 л в тех же условиях в течение 72 ч, добавляя 3% метанола каждые 12 ч. Далее культуральную жидкость отделяли от биомассы дрожжей центрифугированием (10 мин., 7000×g, 4°C), добавляли до 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и до 1 мМ ЭДТА, инкубировали в течение 15 мин с переме-

шиванием, образовавшийся преципитат удаляли центрифугированием при 12000×g, 4°C, 20 мин. Полученную культуральную жидкость анализировали на содержание rhPDGF-BB методом электрофореза (по Лэммли) в 14%-ном ПААГ в невосстанавливающих условиях и использовали для дальнейших экспериментов.

Определение концентрации биомассы проводили измерением значения OD_{600} в 96-луночном планшете в 3 повторах с использованием планшетного ридера “CLARIOstar” (“BMG Labtech”, Германия).

Тангенциальная фильтрация. Тангенциальная фильтрация проводилась с использованием установки “AKTA Flux” и холофайберового картриджа UFP-10-C-4X2MA с площадью мембраны 1400 см² и порогом отсечения 10 кДа (“Cytiva Life Sciences”, Швеция). Осветленную культуральную жидкость разбавляли водой I типа в 2.5 раза и проводили концентрирование при постоянном трансмембранном давлении (ТМД) 0.4 бар. Полученный концентрат имел кондуктивность 20–24 мСм/см.

Для проведения катионообменной хроматографии были использованы следующие буферные растворы: буфер А (50 мМ ацетат натрия, 200 мМ хлорид натрия, pH 4.2), буфер В (50 мМ ацетат натрия, 1 М хлорид натрия, pH 4.2), буфер С – 50 мМ натрий-фосфатный, pH 7.0.

Подбор сорбента для стадии capture. Первоначальный подбор сорбентов осуществлялся методом “хроматографии в объеме” в формате высокопроизводительного скрининга. Для скрининга были отобраны сорбенты: CM Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow, Capto S, Source 30S (“Cytiva Life Sciences”, Швеция), Toyopearl GigaCap S 650-S, Toyopearl GigaCap CM 650-M (“Tosoh Bioscience”, Япония) в объеме 100 мкл в пробирках объемом 2 мл. После промывки водой I типа добавляли 1 мл стартового буфера А и уравнивали 30 мин при перемешивании на платформе. Подготовленную культуральную жидкость, содержащую rhPDGF-BB, сконцентрировали на центрифужных кассетах “Amicon Ultra-15 10K” (“Merck-Millipore”, США). Фактор концентрации – 10×. В пробирки добавили по 1 мл концентрата культуральной жидкости и инкубировали с сорбентом в течение ночи. На следующий день собрали культуральную жидкость из пробирок с сорбентом в отдельные пробирки, сорбенты промыли 1 мл стартового буферного раствора 2 раза по 500 мкл. Для определения профиля элюции добавляли к сорбенту поочередно 3 раза по 100 мкл буферного раствора, содержащего 300 мМ NaCl, инкубировали на качающейся платформе 10 мин, осаждали сорбент в мини-центрифуге в указанном выше режиме. Три фракции элюции объединяли в один образец объемом 300 мкл. Таким же образом проводили элюцию буферными растворами с 450, 550

и 700 мМ NaCl. После завершающей элюции к сорбенту добавляли 1 мл буферного раствора В, инкубировали на качающейся платформе в течение 1 ч для удаления связанных с сорбентом примесей. Полученные фракции (фракция белков, не связавшихся с сорбентом; фракции, элюированные 300, 450, 550, 700 мМ NaCl; фракция отмывки буфером В) анализировали электрофоретическим методом как указано выше. Количественная оценка проводилась построением денситограмм с помощью ПО ImageJ (Сайт программы <https://imagej.nih.gov/ij/>). Все значения нормировались по полосе контрольного образца очищенного rhPDGF-BB, а затем высчитывали процент от суммарной площади пиков денситограммы для одного сорбента, по полученным значениям строились графики элюции для всех сорбентов с помощью ПО Magic Plot Pro 3.0 ("Magicplot Systems", Россия).

Хроматография в проточном режиме. Хроматографию в проточном режиме выполняли вручную в проточных колонках "PD-10" с внутренним диаметром 15 мм ("Cytiva Life Sciences", Швеция). По 0.5 мл отобранного сорбента уравнивали 10 объемами буферного раствора А и наносили по 50 мл подготовленной культуральной жидкости, фракцию несвязавшихся белков собирали. После нанесения образца промывали 10 объемами буферного раствора А и проводили ступенчатую элюцию 3 объемами буферных растворов с содержанием хлорида натрия 400, 600 и 800 мМ, фракции собирали. После элюции промывали сорбент 10 объемами буфера В для удаления связанных примесей. Анализ полученных данных проводили аналогично предыдущему эксперименту.

Хроматография в динамическом режиме выполнялась с использованием "АКТА Pure 25" и колонки ХК 16/10 ("Cytiva Life Sciences", Швеция) при объеме сорбента Toyopearl GigaCap CM 650-M 5 мл и комнатной температуре. Концентрат культуральной жидкости наносили на уравновешенный буфером А сорбент со скоростью 2 мл/мин, промывали стартовым буфером и элюировали градиентом концентрации NaCl от 200 до 1000 мМ за 10 объемов. В параллельном эксперименте проводили дополнительную отмывку буфером С перед стадией элюции. Собранные фракции анализировали методом электрофореза как указано выше.

Анионообменная хроматография выполнялась в режиме "В проскок" с использованием хроматографа "АКТА Pure 25" и колонки HiTrap Q Sepharose HP объемом 1 мл (Cytiva Life Sciences, Швеция). Образец rhPDGF-BB предварительно перед нанесением разбавляли буфером С в 10 раз. Образец наносили на предварительно уравновешенный буфером С сорбент со скоростью 1.5 мл/мин, фракцию несвязавшихся белков собирали. Содержание rhP-

DGF-BB во фракции анализировали методом электрофореза в ПААГ (как указано выше), содержание хозяйских белков (НСР) во фракции анализировали методом сэндвич-ИФА, как описано ниже.

Определение содержания хозяйских белков (НСР). Для определения содержания НСР использовали 4 образца rhPDGF-BB, полученных после очистки: методом катионообменной хроматографии с использованием HiTrap Capto S 1 мл ("Cytiva Life Sciences", Швеция), методом аффинной хроматографии с использованием HiTrap Heparin Sepharose HP 1 мл ("Cytiva Life Sciences", Швеция), катионообменной хроматографии с использованием Toyopearl GigaCap CM 650-M 5 мл и анионообменной хроматографии в проскок на HiTrap Q Sepharose HP 1 мл. Для хроматографии на Capto S концентрат культуральной жидкости наносили на сорбент со скоростью 2 мл/мин, промывали буфером А и элюировали градиентом от 200 до 1000 мМ NaCl. Для хроматографии на Heparin Sepharose HP элюат со стадии Capto S (кондуктивность 45 мСм/см) наносили на колонку со скоростью 2 мл/мин. Сорбент после нанесения отмывали буферным раствором 50 мМ ацетата натрия, 0.1% Triton X-114, pH 5.0. Элюировали линейным градиентом от 400 до 1200 мМ NaCl. Определение содержания НСР в образцах очищенного rhPDGF-BB проводили методом сэндвич-ИФА с помощью набора "Pichia pastoris НСР ELISA Kit" (F140, "Cygnus Technologies", США) по "уточненному" протоколу производителя.

Определение пролиферативной активности. Пролиферативную активность полученного препарата rhPDGF-BB после очистки производили методом WST-1-теста (ab155902, "Abcam", США) по "уточненному" протоколу с использованием клеточной линии фибробластов мыши 3Т3, в качестве отрицательного контроля — клеточной линии HEK293F. В 96-луночный планшет были высеяны клетки линии 3Т3 и HEK293F плотностью 1.5×10^3 кл./лунку в питательной среде DMEM (2183101, "Sigma-Aldrich", США) с добавлением 10% фетальной сыворотки (F6765, "Sigma-Aldrich"). Клеточную линию инкубировали 6 ч, затем питательную среду заменили на DMEM с добавлением 0.5% фетальной сыворотки и инкубировали еще 24 ч. По истечении 24 ч заменили среду на DMEM с добавлением полученного rhPDGF-BB (раствор в 10 мМ уксусной кислоте) в концентрациях 0–250 нг/мл. Клетки инкубировали с ростовым фактором в течение 48 ч. После этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл WST-1 реактива, инкубировали 4 ч, затем измеряли поглощение света при длинах волн 440 и 660 нм, как указано в методике производителя реактива. Пролиферативную активность оценивали построением кривых зависимости поглощения A440-A660 от десятичного логарифма концентрации rhPDGF-BB в ПО SigmaPlot 6.0 ("Systat Software", США), по

построенной зависимости рассчитывали эффективную концентрацию ростового фактора (ED_{50}).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез rhPDGF-BB. В выбранных условиях культивирования продуктивность отобранных клонов составила около 90 мг/л культуры, что является наибольшим результатом из всех, зафиксированных в литературе (рис. 2). Предполагается, что этому способствовало в том числе добавление в питательную среду сорбитола, который может утилизироваться *P. pastoris* и не репрессирует при этом промотор *AOX1*.

Малое количество собственных секретируемых белков *P. pastoris* позволило разработать эффективную методику выделения и очистки rhPDGF-BB.

Оптимизация метода выделения и очистки rhPDGF-BB человека. В ходе анализа существующих методов очистки rhPDGF-BB (рис. 1) были выявлены их недостатки. Метод № 1 [11] является модификацией схемы выделения PDGF-BB из тромбоцитов крови человека, и содержит такие стадии, как ВЭЖХ и диализ. Метод № 2 [9] предполагает разделение PDGF-BB линейным градиентом ацетонитрила при температуре 85°C, что является решением для анализа, а не для препаративного выделения. В методе № 3 [12] применение гидрофобной хроматографии может привести к высоким потерям белка, а применение диализа не соответствует концепции “Quality by Design”. Можно заключить, что эти методики можно использовать в лаборатории, но неэффективно применять в промышленности.

Поскольку rhPDGF-BB секретируется продуцентом в среду, существует потребность в быстрой обработке больших объемов культуральной жидкости (КЖ), для чего подходит метод ультрафильтрации. Однако выяснилось, что rhPDGF-BB уже при ТМД = 0.7 бар выпадает в осадок, из которого активную молекулу восстановить не удается. Это происходит, предположительно вследствие того, что PDGF-BB является димерным гликопротеином со значительным количеством гидрофобных участков на поверхности молекулы. Оптимальные параметры процесса – скорость подачи 0.36 л/мин/м² при ТМД не более 0.4 бар. Мембрана с порогом отсека 10 кДа позволяет эффективно удерживать целевой белок и избавляться от низкомолекулярных компонентов культуральной среды, что упростило дальнейшую очистку.

На сегодняшний день жидкостная хроматография является наиболее популярным методом очистки рекомбинантных белковых субстанций. Согласно современным представлениям, в ходе этого процесса молекулы белка переносятся подвижной фазой по интерстициальным порам неподвижной фазы в процессе конвекции; далее из

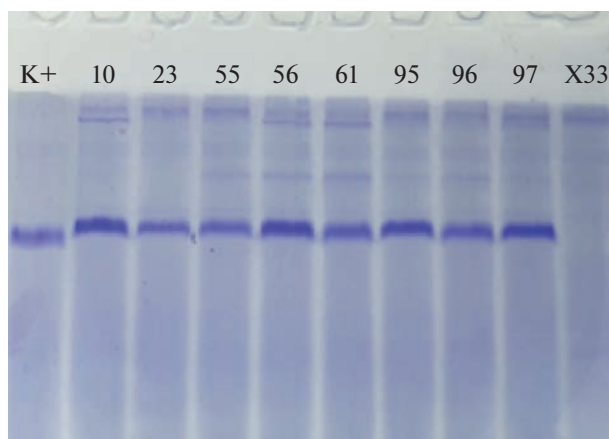


Рис. 2. Анализ образцов культуральной жидкости *P. pastoris*, содержащих rhPDGF-BB, методом электрофореза в 14% – ном ПААГ в нередуцирующих условиях. Окраска Coomassie Brilliant Blue R250. К+ – очищенный препарат rhPDGF-BB (0.5 мкг/лунку), 10–97 – номера клонов; X33 – культуральная жидкость нетрансформированного штамма *P. pastoris*.

потока жидкости они диффундируют к поверхности гранулы сорбента, и наконец, проникнув в поры сорбента, адсорбируются на их внутренней поверхности. Количество адсорбционных взаимодействий напрямую зависит от площади доступной для этого поверхности – и в первую очередь, от количества и размера пор сорбента. Материал, из которого изготовлена матрица сорбента, должен минимизировать нежелательные явления, такие как неспецифическое связывание компонентов с матрицей. Пористость сорбента (отношение объема пор к общему объему неподвижной фазы) должна обеспечивать высокую удельную поверхность, при этом, поры должны быть достаточно велики, чтобы молекулы белка могли бы в них проникать и взаимодействовать с поверхностью, даже когда часть поверхности уже занята адсорбированным белком. Это напрямую влияет на такой параметр, как динамическая ёмкость сорбента. Наконец, лиганд, модифицирующий поверхность стационарной фазы, и его структура обеспечивают селективность взаимодействия между стационарной фазой и молекулой белка. Перечисленные свойства являются основой для подбора стационарной фазы для конкретного хроматографического процесса [13].

В настоящее время при разработке процесса очистки рекомбинантных белков широко применяется концепция CIPF (“Захват”, “промежуточная очистка”, “тонкая очистка”; capture, intermediate purification, polishing) [14].

Основным направлением разработки стадии “захвата” должно быть достижение максимальной динамической емкости сорбента и селективности по целевому белку, а также высокой про-

дуктивности процесса. Изоэлектрическая точка молекулы hPDGF-BB имеет значение 9.8, молекула теряет стабильность и распадается до мономеров при значениях $\text{pH} > 7$. Именно поэтому для всех буферных растворов было выбрано значение pH 4.5. При таком pH димер hPDGF-BB стабилен и может храниться при 4°C . Исходя из этих данных, предполагалось, что наилучшим вариантом для первой стадии очистки hPDGF-BB станет катионообменный сорбент на основе полимеров, устойчивых к высоким скоростям потока. Примером такого сорбента может служить Carpto S – сильный катионообменник на основе высокосшитой агарозы, имеющий достаточно крупный размер частиц 90 мкм, в котором матрица и сульфонатная группа разделены спейсером, что призвано увеличить доступность лиганда для белка. Считается, что оптимальный размер пор сорбента должен быть примерно в 10 раз больше, чем размер молекулы целевого белка. Приблизительный размер молекулы hPDGF-BB – 1.5 нм; размер пор сорбента Carpto S – 50 нм. При этом по результатам экспериментов он не показал достаточную эффективную емкость – потери целевого белка составили не менее 35%.

Сорбенты Sepharose Fast Flow при одинаковом среднем размере гранул отличаются более широким распределением пор по размерам – от 29 до 70 нм, что может обеспечить большую площадь адсорбции и меньше стерических затруднений для молекул белка. При этом, использование сорбента CM Sepharose FF привело к потерям целевого белка практически таким же, как и при использовании Carpto S, при полностью протонированной карбоксиметильной группе ($\text{pKa} = 4.7$). Более высокую емкость сорбента SP Sepharose FF по целевому белку hPDGF-BB можно объяснить гидрофобными взаимодействиями сульфопропильного радикала с целевым белком, усиливающим связывание молекулы с сорбентом. Предполагается, что эти дополнительные взаимодействия также ответственны за “тянущийся” пик целевого белка в ходе элюции, характерный для хроматографии гидрофобных взаимодействий.

Культуральная жидкость *P. pastoris* содержит большое количество солей, пигментов, компонентов питательной среды, а также небольшое количество секретируемых клеткой белков. Органические компоненты могут конкурировать с целевым белком за адсорбционные центры сорбента и вытеснять часть белка, снижая емкость. В этом процессе большую роль играет материал сорбента, на котором может происходить неспецифическая адсорбция. Считается, что синтетические матрицы обеспечивают большую неспецифическую сорбцию компонентов, чем агарозные; однако по результатам наших экспериментов такого не наблюдалось, поскольку при одинаковых условиях нанесения и элюции сорбенты с синте-

тическими матрицами Source 30S, и ToyoPearl GigaCap S-650 и CM-650 показали даже большую емкость, чем SP Sepharose FF. При использовании Source и ToyoPearl наблюдалась меньшая сорбция гидрофобных пигментов, и их было проще удалить с сорбента в ходе отмывки. Меньший эффект неспецифической сорбции, по-видимому, проявлялся и в том, что в случае сорбентов с синтетической матрицей элюционная фракция была более концентрированной, не наблюдалось “хвостов”. Помимо этого, высокую емкость сорбентов ToyoPearl объясняет гораздо больший средний размер пор – 100 нм, тогда как для сорбентов Source, несмотря на меньший размер частицы (30 мкм) и предполагаемую меньшую удельную площадь адсорбции, спейсерная конструкция лиганда, вероятно, обеспечивала большую доступность функциональной группы для целевого белка.

Таким образом, сорбенты, показавшие наибольшую емкость по hPDGF-BB (Source 30S, GigaCap S 650 и GigaCap CM 650) были отобраны для дальнейшего скрининга в проточных колонках. Полученные фракции исследовали на содержание hPDGF-BB (рис. 3а) и оценивали профиль элюции по вышеописанной методике (рис. 3б).

Для достижения большей селективности по целевому белку в рамках одного хроматографического процесса подбирают одну или несколько стадий отмывки: сорбент со связанным белком промывают буферным раствором, в котором содержатся в небольших концентрациях детергенты (например, Tween-20), хаотропные агенты или соли. Это позволяет удалить с сорбента слабо связанные примеси. При этом, по результатам экспериментов отмывка буферными растворами с концентрацией хлорида натрия 0–400 мМ, а также с добавлением 0.5% Tween-20 не привела к десорбции примесей. Альтернативным солевого градиенту методом элюции считается pH -зависимая элюция. Этот метод часто используется для разделения белков с близкими значениями pI . Для осуществления pH -зависимой элюции широко используются “слабые” ионообменники, например, модифицированные карбоксиметильным лигандом (CM) [15].

Известно, что секретом *P. pastoris*, культивируемых с использованием метанола, включает в себя более 75 различных белков, большинство из которых имели $\text{pI} = 6.0$ или менее [16]. Было сделано предположение, что неактивный мономер hPDGF-BB при pH 6.0 и более будет иметь меньшую силу связи с катионообменным сорбентом, чем активный димер. Исходя из этого было решено провести отмывку сорбента буферным раствором со значением pH 7.0. Для этого оптимальным выбором стала натрий-фосфатная буферная система. По результатам электрофореза в ПААГ вы-

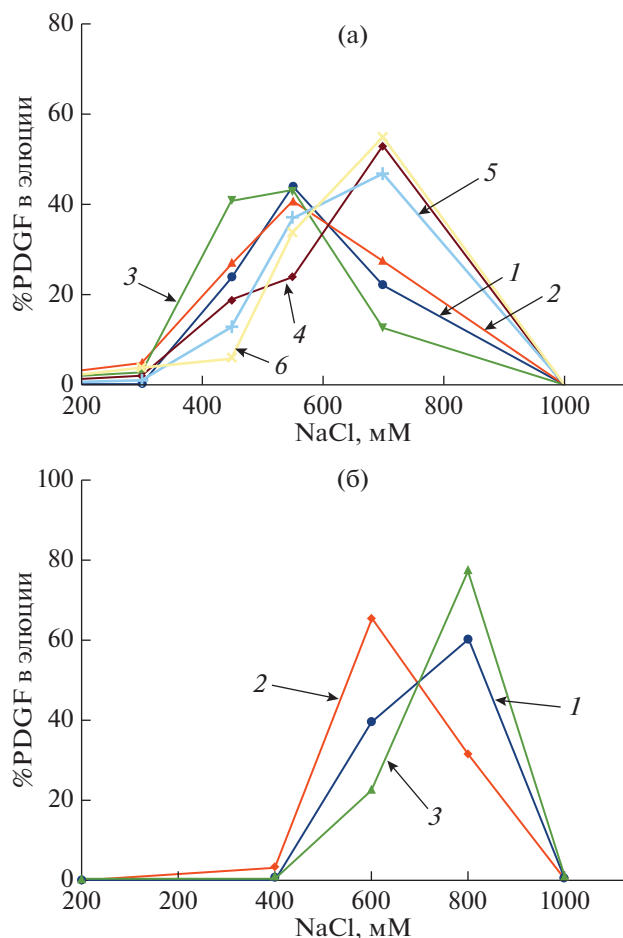


Рис. 3. Профили элюции rhPDGF-BB с различных катионообменных сорбентов. а – профили элюции в статическом режиме: 1 – CM Sepharose, 2 – SP Sepharose, 3 – Capto S, 4 – Source 30S, 5 – GigaCap S 650S, 6 – GigaCap CM 650M; б – профили элюции в проточном режиме: 1 – Source 30S, 2 – GigaCap S 650S, 3 – GigaCap CM 650M.

яснилось, что такая отмывка помогала эффективно удалять мономер rhPDGF-B, некоторые примесные белки продуцента, а также большое количество пигментов, при этом не увеличивая потери функционального rhPDGF-BB. По электрофореграмме (рис. 4) отчетливо видно, что во фракциях отмывки содержались примесные белки (Э1, указан стрелкой) и мономер rhPDGF-B (Э2, указан стрелкой), и не содержалось целевого белка rhPDGF-BB, который полностью элюировался в градиенте концентрации NaCl, начиная с 450 мМ. Таким образом с помощью кратковременной процедуры, без использования трудноудаляемых детергентов, удалось повысить чистоту элюционной фракции rhPDGF-BB до >98%.

Наибольшую емкость (60 мг rhPDGF-BB/мл сорбента) и возможность проведения отмывки при щелочном pH сочетает в себе слабый катио-

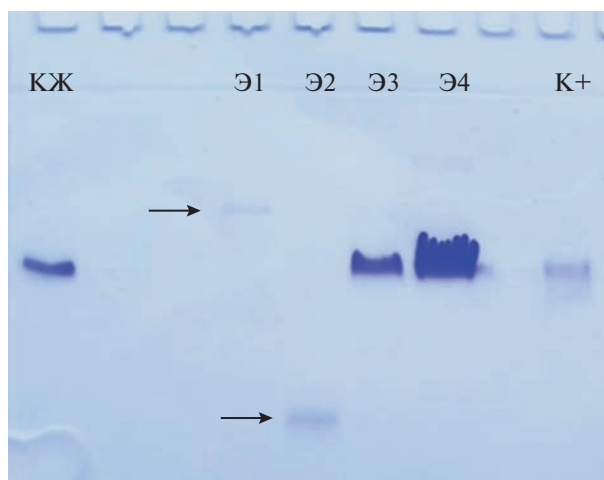


Рис. 4. Отмывка сорбента буферным раствором с pH 7.0 на стадии захвата. Э1–Э2 – фракции отмывки белка буферным раствором pH 7.0; Э3–Э4 – фракции элюции белка с сорбента Toyopearl GigaCap CM 650-M линейным градиентом от 0 до 1 М NaCl.

нообменник Toyopearl GigaCap CM 650-M, который и был выбран для первой стадии очистки.

Известно, что димер PDGF-BB обладает сильным специфическим сродством к гепарину [17]. Для очистки таких белков были созданы аффинные сорбенты с пришитым гепарином. Такая хроматография имеет ряд преимуществ. Например, нет необходимости в сильном разбавлении наносимого образца, кроме того, потенциально можно избавиться от большого количества примесей. Однако при промышленном производстве применению такой методики мешает: относительно низкая допустимая рабочая скорость потока, ограниченный срок хранения сорбента из-за присутствия гепарина; более того, гепарин, которым модифицированы гранулы сорбента, имел животное происхождение, что недопустимо на биофармацевтическом производстве, организованном по стандартам GMP. Как альтернативу решено было протестировать подход, широко используемый в производстве биофармацевтических препаратов для удаления примесей, источником которых является продуцент – анионообменную хроматографию в режиме “проскока”. В таком режиме раствор целевого белка пропускается через колонну с сорбентом, на котором не происходит его связывания, но при этом с сорбентом связываются примеси, которые необходимо удалить. Этот подход был протестирован для удаления НСР из препарата rhPDGF-BB после стадии катионообменной хроматографии. pH буферных систем при этом был подобран в таком интервале, чтобы быть меньше, чем pI rhPDGF-BB, но больше, чем теоретический pI хозяйских белков, что позволяло адсорбировать хозяйские белки на анионообменнике без адсорбции целевого белка. Фракции rhPDGF-BB до и по-

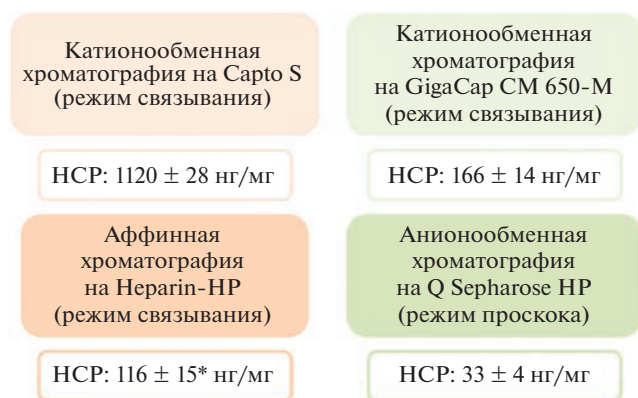


Рис. 5. Содержание примесных хозяйских белков *P. pastoris* после хроматографической очистки rhPDGF-BB.

сле проведения хроматографии проанализировали с помощью коммерческого набора *Pichia pastoris* HCP ELISA Kit (“Cygnus Technologies”, США).

При расчете концентрации HCP были получены значения, указанные на рис. 5. Проведено сравнение результатов со значениями, полученными при очистке rhPDGF-BB по методике с использованием Heparin Sepharose HP и отмывки с 0.1%-ным Triton X-114 (запрещен для использования в биофармацевтической промышленности).

Полученные данные свидетельствовали о том, что с помощью анионообменной хроматографии “в проскок” можно эффективно избавиться от примесей белков продуцента. Такой подход более удобен, так как на рынке доступно множество сорбентов марки Q с различным типом матрицы, для хроматографии необходим 1 буферный раствор, уменьшаются потери белка и трудоемкость очистки.

В современной биотехнологии до сих пор стандартом производства является периодический процесс, в ходе которого одна партия продукта обрабатывается за один технологический цикл. Большими преимуществами обладают непрерывные процессы: считается, что замена периодического процесса на непрерывный в рамках производства может увеличить продуктивность, уменьшить при этом количество и габариты оборудования, размеры производственной площадки, стоимость продукта, а также возможность быстро проводить очистку нестабильных молекул. Для *P. pastoris* в последние годы интенсивно разрабатываются непрерывные технологии культивирования [18–20], что в свою очередь формирует запрос на разработку непрерывных процессов хроматографической очистки. Один из способов проведения непрерывной хроматографии подразумевает использование вместо одной большой колонны с сорбентом несколько маленьких, работающих параллельно: пока на одной колонке происходит нанесение, на

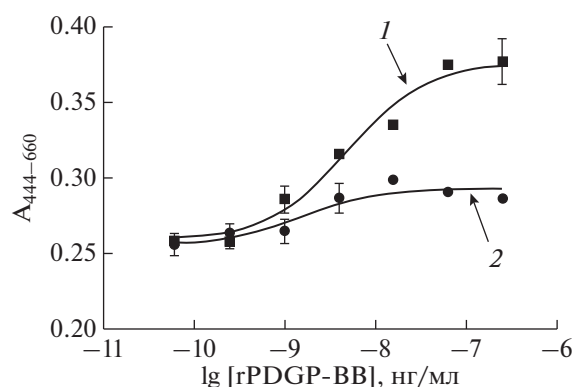


Рис. 6. Анализ пролиферативного эффекта rhPDGF-BB, полученного по оптимизированной методике, методом WST-1-теста. 1 – клеточная линия фибробластов 3Т3, 2 – клеточная линия HEK293F.

другой идет элюция, на третьей – санация и т.д. Такой подход может значительно увеличить продуктивность очистки рекомбинантных белков из КЖ *P. pastoris*, так как из всех этапов очистки наибольшее время занимает нанесение большого объема КЖ на стадии захвата, что влечет за собой негативные последствия для качества целевого белка, а также длительный простой оборудования для проведения следующих этапов очистки. В разработанной схеме хроматографической очистки, в отличие от существующих решений, основной объем примесей удаляется уже на стадии катионообменной хроматографии, тогда как на стадии анионообменной хроматографии удалялись остаточные примеси, при этом пробоподготовка между двумя стадиями требовалась минимальная. В перспективе не составит труда вместо одной пары колонок взять их несколько, и проводить непрерывную очистку rhPDGF-BB небольшими партиями. Таким образом, разработанная в работе схема очистки может рассматриваться как наиболее близкая к непрерывному процессу.

Определение активности rhPDGF-BB. Полученный по оптимизированной методике rhPDGF-BB в ходе WST-теста показал пролиферативную активность на культуре фибробластов 3Т3, сравнимую с пролиферативной активностью аналогов (рис. 6). Фибробласты 3Т3 имеют мезенхимальное происхождение и экспрессируют на поверхности мембраны рецепторы к hPDGF-BB. Расчетная эффективная концентрация ED₅₀ rhPDGF-BB составила 5.0 ± 2.64 нг/мл.

Предложен оптимизированный метод получения активного rhPDGF-BB высокой чистоты. Оптимизация методики выделения и очистки позволила упростить схему за счет исключения тру-

доемких стадий. Полученный rhPDGF-BB имел чистоту >98% по результатам электрофореза в ПААГ, с содержанием неактивного мономера <1% и НСР 29–37 нг/мг белка. Было установлено, что полученный таким методом rhPDGF-BB оказывал пролиферативный эффект на фибробласты 3Т3, эффективная концентрация составляла 5.0 ± 2.64 нг/мл. Полученные результаты могут быть использованы для разработки более эффективной и экономически выгодной промышленной технологии для использования в регенеративной медицине и исследованиях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heldin C.H., Westermark B.* // *Physiol. Rev.* 1999. V. 79. № 4. P. 1283–1316.
2. *Fu X., Cheng B.* *Regenerative Medicine in China.* / Ed. X. Fu. Singapore: Springer, 2021. 485 p.
3. *Blume P., Bowlby M., Schmidt B., Donegan R.* // *Chronic Wound Care Management and Research.* 2014. V. 1. P. 11–14.
4. *Kaigler D., Avila G., Wisner-Lynch L., Nevins M.L., Nevins M., Rasperini G. et al.* // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011. V. 11. № 3. P. 375–380.
5. *Younger A., Penner M., Montijo H.E.* // *Foot Ankle Clin.* 2016. V. 21. № 4. P. 771–776.
6. *Patrikoski M., Juntunen M., Boucher S., Campbell A., Vemuri M.C., Mannerstrom B. et al.* // *Stem Cell Res. Ther.* 2013. V. 4. № 2. <https://doi.org/10.1186/scrt175>
7. *Oefner C., D'Arcy A., Winkler F.K., Eggimann B., Hossang M.* // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 11. P. 3921–3926.
8. *Babavalian H., Latifi A.M., Shokrgozar M.A. et al.* // *Cellular and Molecular Biology.* 2016. V. 62. № 8. P. 45–51.
9. Патент США. 2006. № 7084262.
10. *Sambrook J., Green M.R.* *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 4th Ed. V. 3. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1546 p.
11. *Ostman A., Backstrom G., Fong N., Betsholtz C., Wernstedt C., Hellman U. et al.* // *Growth Factors.* 1988. V. 1. № 3. P. 271–281.
12. *Dai M., Yu C., Fang T., Ling F., Wang J., Zhang J. et al.* // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12: e0145419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145419>
13. *Ersson B., Rydén L., Janson J.-C.* *Introduction to Protein Purification.* In: *Protein Purification.* / Ed. J.-C. Janson. Canada: John Wiley & Sons, 2011. P. 1–22.
14. *Cytiva Life Sciences.* *Strategies for Protein Purification: Handbook.* UK: Little Chalfont, 2021. P. 41–51.
15. *Sánchez-Trasviña C., Flores-Gatica M., Enriquez-Ochoa D., Rito-Palomarez M., Mayola-Deloisa K.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.717326>
16. *Huang C.J., Damasceno L.M., Anderson K.A., Zhang S., Old L.J., Batt C.A.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 90. № 1. P. 235–247.
17. *Schilling D., Reid J. IV, Hujer A. et al.* // *Biochem. J.* 1998. V. 333. № 3. P. 637–644.
18. *Nieto-Taype M.A., Garcia-Ortega X., Albiol J., Luis Montesinos-Seguí J., Valero F.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. № 632. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00632>
19. *Cos O., Ramón R., Montesinos J.L., Valero F.* // *Microb. Cell. Fact.* 2006. V. 5. № 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17>
20. *Rahimi A., Hosseini S., Karimi A., Aghdasinia K., Mianroodi R.A.* // *Biochem. Eng. J.* 2019. V. 141. P. 112–119.

Purification Method Optimization of Recombinant Platelet-Derived Growth Factor rhPDGF-BB Expressed in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*

A.-A. V. Misterova^a, *, V. A. Chicherin^a, and A. S. Gerasimov^a

^a*Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia*

**e-mail: usr21438@vyatsu.ru*

Recombinant human platelet-derived growth factor rhPDGF-BB is one of the major cytokines, which has been approved for medical use. Medical drug “becaplermin”, containing rhPDGF-BB has been approved for neuropathic ulcer and severe skin burns treatment, as well as in periodontal surgery (in combination with osteoconductive matrices). In this article, we sought to optimize purification process to obtain high purity rhPDGF-BB using methylophilic yeast *Pichia pastoris* – a production host for rhPDGF-BB. A faster and simpler chromatography purification method has been suggested which allows to obtain rhPDGF-BB with purity >98% as determined by SDS-PAGE and containing host cell proteins (HCP) 33 ± 4 ng/mg, as measured by ELISA. The effective proliferative dose of rhPDGF-BB measured by WST-1 proliferative assay on 3T3 mouse fibroblast cell culture is 5.02 ± 2.64 ng/mL, which is comparable to commercially available analogues. The optimized method can be attractive for production scale use.

Keywords: Human platelet-derived growth factor, growth factors, *Pichia pastoris*, diabetic foot ulcers, recombinant proteins

УДК 57.088.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛИННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ С ГЕНОМНОЙ ДНК И КДНК КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ

© 2023 г. А. Д. Антипов¹, Н. Е. Злобин¹, *

¹Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

*e-mail: stresslab@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Амплификация длинных фрагментов со сложных матриц, таких как геномная ДНК эукариот, является сложной задачей для большинства ДНК-полимераз. В работе проведено сравнение эффективности 6 вариантов ДНК-полимераз для амплификации с геномной ДНК картофеля *Solanum tuberosum* полноразмерных последовательностей генов, кодирующих факторы инициации трансляции семейства eIF4E, а также для синтеза фрагментов генома вируса Y картофеля с кДНК растений картофеля, зараженных этим вирусом. Было установлено, что эффективность амплификации различными ДНК-полимеразами в целом падала с увеличением длины ампликонов. Наибольшую эффективность синтеза длинных фрагментов продемонстрировали полимеразы LongAmp и Platinum SuperFi II, которые позволяли с высокой эффективностью синтезировать ПЦР-продукты длиной более 10 тысяч пар оснований, наименьшую – полимеразы Encyclo. Ни одна из ДНК-полимераз не обеспечила эффективную амплификацию всех исследованных фрагментов ДНК. В то же время, любой из исследованных фрагментов ДНК мог быть амплифицирован с помощью не менее чем одного варианта ДНК-полимеразы. Таким образом, выбор ДНК-полимеразы имел ключевое значение для эффективности синтеза определенного ПЦР-продукта.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, ПЦР длинных фрагментов, ДНК-полимеразы

DOI: 10.31857/S0555109923040025, **EDN:** QYRYJY

Полимеразная цепная реакция является одним из базовых методов, без которого практически невозможно представить работу современной молекулярно-биологической лаборатории. Отличительной особенностью этого метода является его универсальность, то есть способность эффективно синтезировать разнообразные нуклеотидные последовательности с образцов ДНК, выделенных из различных организмов. Однако все еще существуют некоторые приложения ПЦР, для которых этот метод демонстрирует сниженную эффективность, одним из которых является амплификация длинных последовательностей ДНК [1]. К длинным обычно относят ампликоны более 4–5 т.п.о. Амплификация подобных последовательностей не входит в число наиболее рутинных применений ПЦР, однако может требоваться для решения различных научных задач, связанных с молекулярным клонированием или генетическим анализом. Так, методы высокопроизводительного секвенирования позволяют осуществлять параллельное таргетное секвенирование большого количества ампликонов, позволяя характеризовать выбранный

участок генома в большом числе биологических образцов, что является относительно простой и дешевой альтернативой полногеномному секвенированию [2–6]. Секвенирование длинных ампликонов позволяет анализировать полные последовательности эукариотических генов или даже целых генетических кластеров [7–11], а также полных геномов вирусов [12–15].

Для эффективной амплификации длинных фрагментов предложены различные подходы, вплоть до весьма экзотических, например основанные на дизайне праймеров со специальными довесками, обеспечивающими внутримолекулярную гибридизацию ампликонов [16, 17], а также использовании дополнительных ферментов [18]. Широко применимым способом повышения эффективности синтеза длинных фрагментов в ПЦР является использование специальных ДНК-полимераз [8, 15, 19, 20]. Хотя амплификация длинных фрагментов и считается трудной задачей для большинства ДНК-полимераз, в настоящий момент имеется множество вариантов этих фермен-

тов, которые предлагаются производителями как специально предназначенные или, по крайней мере, подходящие для синтеза длинных ампликонов. Однако, как справедливо замечено в работе [8], объем информации об исследовании пригодности того или иного варианта полимеразы для амплификации длинных последовательностей в научной литературе обычно невелик. При этом, такие данные в целом можно считать более эффективными, чем информация, предоставляемая производителями ДНК-полимераз.

Многие сельскохозяйственные растения имеют сложные полиплоидные геномы большого размера. Геномная ДНК, выделенная из растений с помощью стандартных методов, часто содержит большое количество различных примесей, отрицательно влияющих на эффективность ПЦР [21].

Цель работы – сравнение эффективности 6 вариантов ДНК-полимераз для амплификации длинных последовательностей с геномной ДНК картофеля *Solanum tuberosum* – растения, для которого характерно высокое содержание фенолов, ингибирующих ПЦР [22–24]. Кроме того, было осуществлено сравнение эффективности этих ДНК-полимераз для амплификации последовательности вируса Y картофеля (PVY) с кДНК, синтезированной с общей РНК зараженных PVY растений этой культуры.

МЕТОДИКА

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение ДНК из растительного материала листовых тканей картофеля проводили модифицированным методом ЦТАБ [25]. Выделение общей РНК вируса из растительного материала листовых тканей картофеля, зараженного PVY, проводили реагентом ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества геномной ДНК и общей РНК осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле.

Получение кДНК вируса Y картофеля. Проверка зараженности PVY растений картофеля сорта Вектор осуществлялась с помощью набора реагентов PV-001 для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (“Синтол”, Россия). Из растений картофеля *S. tuberosum* сорта Вектор, зараженных PVY, была выделена общая РНК с использованием реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Получение кДНК вируса Y картофеля осуществлялось с использованием ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (“NEB”, США) в соответствии с протоколом производителя.

Подбор праймеров. Подбор праймеров для амплификации полноразмерных последовательностей генов факторов инициации трансляции eIF4E1, eIF4E2, eIF(iso)4E, nCBP осуществлялся к высококонсервативным участкам в 5'-некодирующих

областях этих генов (Fw-праймер) и 3'-некодирующих областях этих генов (Rv-праймер). Высококонсервативные участки были идентифицированы путем анализа имеющихся сборок геномов культурного картофеля *S. tuberosum* сортов MSH14-112 (GenBank: CP046696.1), P8 (GenBank: CP046682.1) и Solyntus (GenBank: CP055236.1), и дикого картофеля *Solanum pinnatisectum* (сорт CGN17745 (GenBank: CP047566.1). Подбор праймеров для амплификации полноразмерного PVY, а также его фрагментов осуществлялся к участкам PVY, консервативным по своей нуклеотидной последовательности в изолятах этого вируса, имеющих различное географическое происхождение (номера в GenBank: OUNKS, AB711155.1; T13, AB714135.1; v942490, EF016294.1; JYW-186, KF770835.1; GZ, MN381731.1; SL50V, MW595187.1). Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Полимеразная цепная реакция. Состав реакционной смеси соответствовал рекомендациям производителей ДНК-полимераз. Для расчета оптимальной температуры отжига праймеров использовались приложения “Tm calculator” фирм NEB (<https://tmcatalog.neb.com/#/main>) и ThermoFisher Scientific (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>). Для полимеразы Encyclo (“Евроген”, Россия) расчет температуры отжига праймеров производился с помощью рекомендованной производителем формулы. ПЦР проводились в амплификаторе “MiniAmp™ Plus Thermal Cycler” (“ThermoFisher Scientific”, США). Условия амплификации приведены в табл. 2. В качестве матрицы использовали пулированную смесь геномной ДНК, выделенную из 10 растений картофеля сорта Жуковский ранний, разведенную в 10 раз ТЕ-буфером. Анализ продуктов амплификации производился методом электрофореза 2 мкл (для генов eIF4E) или 4 мкл, для фрагментов PVY) ПЦР-смеси в 1.2%-ном агарозном геле с использованием маркера 1 kb DNA Ladder (“Евроген”, Россия) в качестве стандарта. Все ПЦР были осуществлены и продукты амплификации проанализированы не менее, чем в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Амплификация полноразмерных последовательностей генов факторов инициации трансляции eIF4E картофеля. Культурный картофель *S. tuberosum* содержит 4 гена, кодирующие факторы инициации трансляции eIF4E – базовый eIF4E1, наиболее гомологичный ему eIF4E2, характерный для различных представителей семейства *Solanaceae* [26], изоформу eIF4E – eIF(iso)4E, а также так называемый новый кэп-связывающий белок nCBP

Таблица 1. Последовательности праймеров, использовавшихся для амплификации

Праймер	Последовательность 5'–3'
Факторы инициации трансляции	
eIF4E1 Fw	tctcatctctcatctgtcctag
eIF4E1 Rv	cacgagttactcaaacccagaagc
eIF4E2 Fw	ccataaccaacccccacaaatttc
eIF4E2 Rv	ctgtattgattgcattccctgttg
eIF(iso)4E Fw	gccactaacatcaatcaattgg
eIF(iso)4E Rv	gctaactgtacaatttcagtattgg
nCBP Fw	ccgattcgtttgtagaagaagg
nCBP Rv	gccagtactggggataatcc
Фрагменты генома вируса	
PVY F1	aattaaacaactcaatacaacataaga
PVY R1	gccaggtccaagcttt
PVY F2	gccaaagcttggaaacctg
PVY R2	gcttcattgttctgccatca
PVY F3	tgatggcagaacaatgaag
PVY R3	gtctcctgattgaagtttacag

[27]. Последовательности генов, кодирующих все 4 варианта факторов инициации трансляции eIF4E картофеля, были идентифицированы в трех отсекуированных к настоящему моменту геномах культурного картофеля *S. tuberosum* и в дикорастущем виде *S. pinnatisectum*. К этим генам были подобраны праймеры (табл. 1), отжигающиеся на высококонсервативных участках в 5'-некодирующей области генов перед старт-кодоном и в 3'-некодирующей области генов после стоп-кодона. Амплификация последовательностей генов факторов инициации трансляции eIF4E картофеля осуществлялась с помощью 6 вариантов ДНК-полимераз – Q5, Phusion, LongAmp (“NEB”, США), Platinum SuperFi II, Phusion (“ThermoFisher Scientific”, США), Encyclo (“Евроген”, Россия). Все эти ДНК-полимеразы позиционируются производителями как пригодные для синтеза длинных ампликонов со сложных матриц, к которым относится геномная ДНК. Для каждого из четырех генов факторов инициации трансляции картофеля по крайней мере с некоторыми из вариантов полимераз удалось получить ПЦР-продукты (рис. 1), по своей длине приблизительно соответствующие предполагаемой длине этих генов. Исключение составлял ген eIF4E1, длина ПЦР-продукта для которого была существенно выше (7000 п.о.), чем предполагаемая из анализа данных сборок геномов (4000–5000 п.о.). Специфичность амплификации была подтверждена секвенированием по Сэнгеру 5'-концевых и 3'-концевых областей ПЦР-продуктов.

Наиболее эффективная амплификация различными вариантами полимераз наблюдалась в отношении генов eIF(iso)4E и nCBP. Эти гены эф-

фективно амплифицировались практически всеми исследованными ДНК-полимеразами, за исключением полимеразы Encyclo, продемонстрировавшей низкую эффективность амплификации в отношении гена eIF(iso)4E (рис. 1). Важно отметить, что в случае eIF(iso)4E различными вариантами полимераз амплифицировались два фрагмента несколько различающейся длины, при этом однако оба фрагмента представляли собой последовательности гена eIF(iso)4E, исходя из секвенирования их концевых участков (данные не приведены). Вероятно, два ПЦР-продукта различной длины обусловлены полиморфизмом гена eIF(iso)4E в сорте картофеля Жуковский ранний, предположительно содержанием в некодирующих областях этого гена протяженных делеций и/или вставок.

Ген eIF4E1 в картофеле сорта Жуковский ранний имел существенно большую длину, чем eIF(iso)4E и nCBP. Эффективная амплификация eIF4E1 наблюдалась с четырьмя вариантами ДНК-полимераз из шести – Q5, обоими вариантами полимеразы Phusion и с LongAmp, при этом последняя продемонстрировала наиболее высокую эффективность. В противоположность этому, амплификация с полимеразы Encyclo и Platinum SuperFi II не приводила к получению детектируемых количеств ПЦР-продукта eIF4E1.

Наименьшая эффективность амплификации наблюдалась в отношении наиболее длинного гена – eIF4E2, размер которого превышал 10000 п.о. Полимераза LongAmp амплифицировала этот ген с сопоставимой эффективностью по сравнению с остальными генами – eIF4E1, eIF(iso)4E и nCBP.

Таблица 2. Условия амплификации

фермент	Состав реакционной смеси	Условия ПЦР генов eIF4E	Условия ПЦР фрагментов 2, 3, 4 PVY	Условия ПЦР фрагмента 1 PVY
Q5	Буфер (5X) – 5 мкл, dNTP (10 mM) – 0.5 мкл, праймер Fw – 1.25 мкл, праймер Rv – 1.25 мкл, полимераза – 0.25 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 16.25 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 64°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 59°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
Platinum SuperFi II	Буфер (5X) – 4 мкл, dNTP (10 mM) – 0.4 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.4 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 12.7 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
Phusion (Thermo Fisher Scientific)	Буфер (5X) – 4 мкл, dNTP (10 mM) – 0.4 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.2 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 12.9 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 62°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 цикл ^в 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
Phusion (NEB)	Буфер (5X) – 4 мкл, dNTP (10 mM) – 0.4 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.2 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 12.9 мкл	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 62°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин	98°C 40 с 30 циклов 98°C 15 с 60°C 20 с 72°C 7 мин 72°C 10 мин
LongAmp	Буфер (5X) – 5 мкл, dNTP (10 mM) – 0.75 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 1 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 15.75 мкл	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 55°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 51°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 50°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин
Encyclo	Буфер (10X) – 2.5 мкл, dNTP (10 mM) – 0.5 мкл, праймер Fw – 1 мкл, праймер Rv – 1 мкл, полимераза – 0.5 мкл, ДНК-матрица – 0.5 мкл, вода – 19 мкл	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 66°C* 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 58°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин	95°C 30 с 30 циклов 95°C 15 с 55°C 20 с 65°C 14 мин 65°C 10 мин

* 63°C при амплификации последовательности гена пСВР.

Полимеразы Platinum SuperFi II, Phusion (“NEB”) и Phusion (“ThermoFisher Scientific”) также позволяли осуществить амплификацию eIF4E2, хотя эффективность ПЦР была очевидно ниже по

сравнению с амплификацией этими полимеразами других трех генов факторов инициации трансляции картофеля. Амплификация eIF4E2 с помощью полимеразы Q5 позволила получить лишь

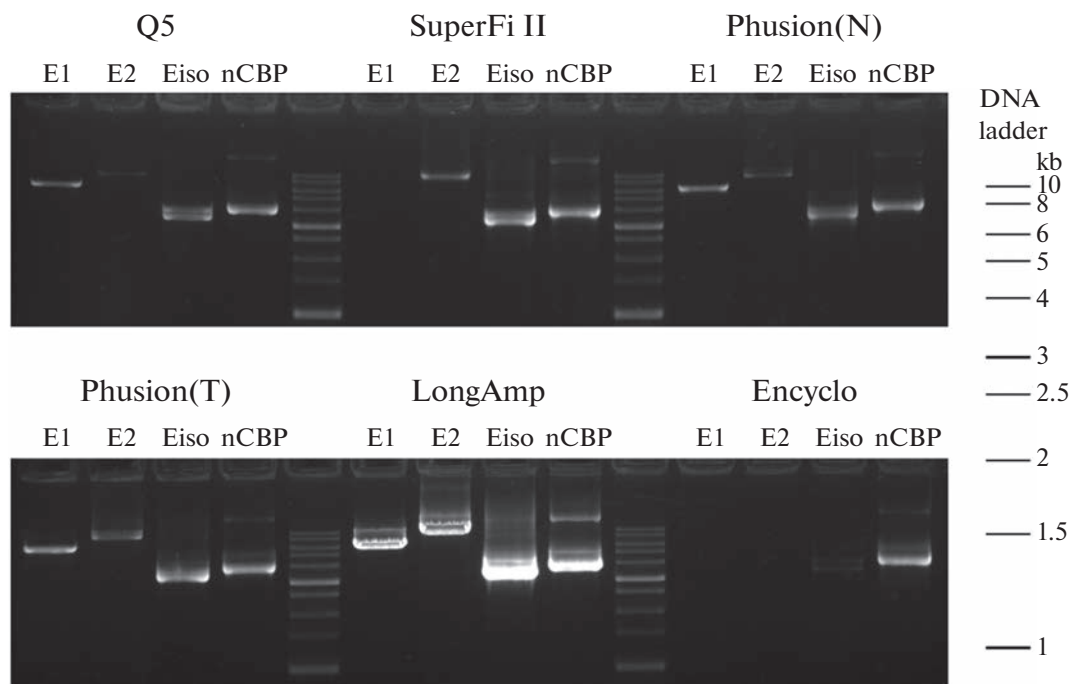


Рис. 1. Амплификация факторов трансляции картофеля eIF4E1 (E1), eIF4E2 (E2), eIF(iso)4E (Eiso) и nCBP 6 вариантами ДНК-полимераз. Phusion(N) – полимеразы Phusion фирмы-производителя “NEB”, Phusion(T) – полимеразы Phusion фирмы-производителя “ThermoFisher Scientific”.

незначительное количество ПЦР-продукта, в то время как использование полимеразы Encyclo не позволило амплифицировать eIF4E2.

Амплификация полноразмерной последовательности вируса Y картофеля PVY с кДНК зараженных растений картофеля. Вирус Y картофеля PVY является наиболее значимым вирусным патогеном этой культуры, геном которого представлен одноцепочечной положительной РНК [28]. Из зараженных PVY растений картофеля сорта Вектор была выделена общая РНК и получена кДНК. С праймеров, отжигающихся на консервативных участках на 5'- и 3'-конце генома PVY, была осуществлена амплификация полноразмерного генома этого вируса с использованием тех же 6 вариантов ДНК-полимераз, которые использовались для амплификации генов факторов инициации трансляции картофеля. Использование полимераз Q5, Phusion (“NEB”), Phusion (“ThermoFisher Scientific”) и Encyclo не привело к накоплению ампликона полноразмерного генома PVY в визуальном детектируемых количествах (рис. 2а). Амплификации удалось добиться с помощью полимераз LongAmp и Platinum SuperFi II, однако накопление ПЦР-продукта в обоих случаях было низким. Кроме того, при амплификации полноразмерного PVY полимеразой LongAmp наблюдалось также образование более короткого ПЦР-продукта длиной около 7000 п.о.

Поскольку эффективной амплификации полного генома PVY не удалось добиться ни с одним из шести исследованных вариантов ДНК-полимераз, к последовательности генома PVY были подобраны внутренние праймеры на высококонсервативные участки, которые позволяли амплифицировать геном PVY в виде перекрывающихся фрагментов (рис. 2б). Фрагмент 1, включавший практически половину генома PVY с 5'-конца и имевший длину около 4800 п.о., в отличие от полного генома PVY амплифицировался большинством вариантов ДНК-полимераз, за исключением Phusion (“ThermoFisher Scientific”). Однако количество синтезированного ПЦР-продукта во всех случаях было низким. Фрагмент 2, включавший в себя 3'-часть генома PVY длиной около 5200 п.о., амплифицировался всеми исследованными вариантами ДНК-полимераз. При этом, выход ПЦР-продукта был высоким для всех вариантов полимераз, кроме Phusion (“ThermoFisher Scientific”).

Фрагмент 3 генома PVY, включавший в себя весь фрагмент 2 и около половины фрагмента 1, имел длину приблизительно 7500 п.о. Увеличение длины амплифицируемой 3'-части генома PVY несколько снизило эффективность амплификации для полимераз Q5 и LongAmp, но не для полимеразы Platinum SuperFi II. Полимеразы Encyclo, Phusion (“NEB”) и Phusion (“ThermoFisher Scientific”) оказались неспособны амплифицировать фрагмент 3, при том что две из них – Encyclo

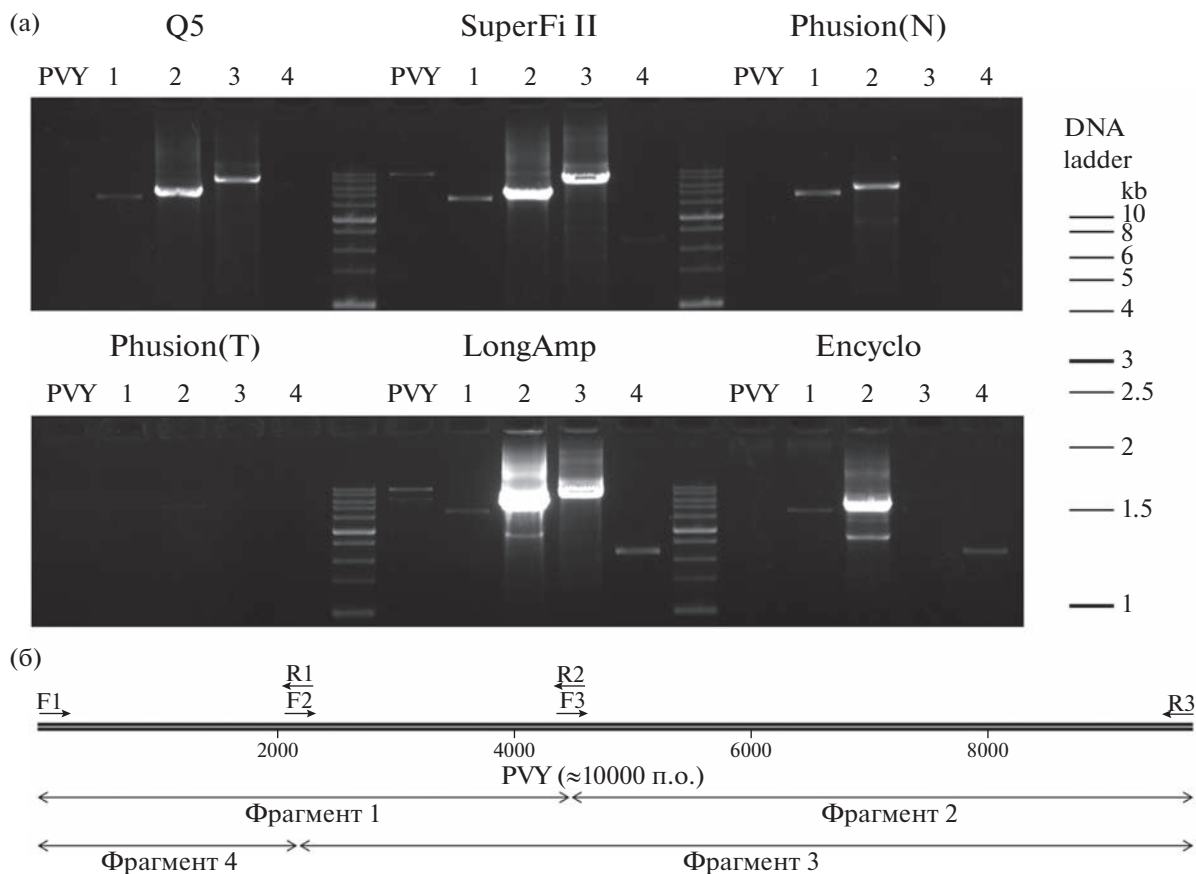


Рис. 2. Амплификация полноразмерного генома вируса *Y* картофеля (PVY) и 4 фрагментов генома вируса (фрагменты 1, 2, 3, 4) с использованием 6 вариантов ДНК-полимераз (а) и схематическое изображение генома PVY, 4 фрагментов генома и расположения праймеров, использовавшихся для амплификации (б). Названия праймеров для амплификации фрагментов генома PVY соответствуют приведенным в табл. 1.

и Phusion (“NEB”) – эффективно амплифицировали более короткий фрагмент 2. Фрагмент 4, включавший 5'-часть генома PVY, амплифицировался в детектируемых количествах только 3 вариантами ДНК-полимераз из 6 – Platinum SuperFi II, Longamp и Encyclo, несмотря на свой небольшой размер (приблизительно 2200 п.о.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе была исследована эффективность 6 вариантов ДНК-полимераз для амплификации длинных нуклеотидных последовательностей с матрицы геномной ДНК и кДНК растений картофеля. В целом, эффективность амплификации при увеличении длины ПЦР-продукта ожидаемо снижалась. Среди факторов инициации трансляции семейства eIF4E, наибольшая эффективность амплификации для всех вариантов ДНК-полимераз наблюдалась в отношении генов eIF(iso)4E и nCBP, длина ампликона для которых была менее 4 т.п.о., т.е. они не относились к условной категории “длинных ампликонов”. Из всех вариантов поли-

мераз, только Encyclo показала неудовлетворительную эффективность в отношении одного из этих относительно коротких ампликонов – eIF(iso)4E. В противоположность этому, добиться высокоэффективной амплификации наиболее длинного гена eIF4E2 удалось с использованием единственного варианта ДНК-полимеразы – LongAmp. Полимераза Platinum SuperFi II также позволяла достаточно эффективно амплифицировать eIF4E2, однако выход ПЦР-продукта был существенно ниже, чем при использовании LongAmp.

При проведении ПЦР с использованием кДНК в качестве матрицы добиться высокоэффективной амплификации полного генома PVY длиной около 10000 п.о. не удалось ни с одним вариантом полимеразы, хотя с помощью Platinum SuperFi II и LongAmp удалось синтезировать визуально детектируемые количества ампликона полноразмерного PVY. Низкий выход ПЦР может быть связан не только с большим размером ампликона, но и с низкой эффективностью амплификации 5'-части генома PVY, наблюдавшейся для всех вариантов ДНК-полимераз. Это по всей видимости опреде-

ляется худшим качеством синтеза кДНК с 5'-частей длинных молекул мРНК, поскольку синтез кДНК происходит в направлении 5'–3' [29]. Действительно, эффективность амплификации фрагментов 2 и 3, расположенных в 3'-части генома PVY, была намного выше, чем фрагментов 1 и 4, расположенных в 5'-части генома вируса, при большей длине ампликонов (рис. 2).

Все исследованные варианты ДНК-полимераз позиционируются производителями как пригодные для амплификации длинных фрагментов. Указанные производителями максимальные длины ПЦР-продукта, допускающие эффективную амплификацию, составляют 20 т.п.о. для Encyclo, Platinum SuperFi II и Phusion (“ThermoFisher Scientific”), и 30 т.п.о. для LongAmp; для Q5 и Phusion (“NEB”) численные данные не приведены. Поскольку протяженность даже наиболее длинных из ампликонов, исследованных в настоящей работе, существенно меньше этих значений, сниженная эффективность их амплификации вероятно связана не только с размерами этих ампликонов, но и с использованием сложных матриц при проведении ПЦР. Загрязнение геномной ДНК картофеля веществами-ингибиторами ПЦР, а также сниженное качество синтеза длинных молекул кДНК, снижает общую эффективность амплификации, что в сочетании с повышенной сложностью синтеза длинных ампликонов вероятно и привело к наблюдаемой в целом невысокой эффективности амплификации наиболее длинных фрагментов как с геномной ДНК, так и с кДНК.

Наибольшую эффективность в амплификации различных длинных последовательностей — как генов eIF4E, так и фрагментов PVY, — продемонстрировала полимераз LongAmp. Использование этой полимеразы позволяло осуществить синтез всех генов eIF4E и всех фрагментов PVY. Однако, если при амплификации генов eIF4E полимераз LongAmp показала эффективность значительно большую, чем остальные варианты ДНК-полимераз, то при амплификации фрагментов PVY для 3 из 5 вариантов фрагментов выход ПЦР-продуктов был низким. Полимераза Platinum SuperFi II, которая в этой работе также продемонстрировала в целом высокую эффективность амплификации различных последовательностей, оказалась неспособной амплифицировать ген eIF4E1, с амплификацией которого справились все остальные варианты полимераз, кроме Encyclo. Оба варианта Phusion продемонстрировали достаточно высокую эффективность при амплификации генов eIF4E; в то же время, полимераз Phusion (“NEB”) эффективно амплифицировала только некоторые фрагменты генома PVY, в то время как полимераз Phusion (“ThermoFisher Scientific”) — ни один из фрагментов PVY. Приведенные выше результаты свидетельствуют о наличии у ДНК-полимераз специфических сложностей с синтезом определенных

ампликонов, разных для различных полимераз. Из этого следует, что для достижения эффективной амплификации конкретной последовательности выбор ДНК-полимеразы имеет ключевое значение. Например, полимераз Encyclo, которая в настоящей работе в целом продемонстрировала наименьшую эффективность, амплифицировала фрагмент 4 PVY более эффективно, чем полимеразы Q5, Platinum SuperFi II и оба варианта полимеразы Phusion.

По литературным данным, синтез коротких нецелевых последовательностей может быть одним из существенных затруднений при проведении ПЦР длинных фрагментов, что определяется в целом более высокой эффективностью синтеза коротких фрагментов по сравнению с длинными [17]. Однако в настоящей работе появление более коротких нецелевых ПЦР-продуктов наряду с длинным целевым практически не наблюдалось, за исключением синтеза небольшого количества коротких нецелевых продуктов при амплификации полноразмерного PVY полимеразой LongAmp, а также фрагмента 2 PVY — некоторыми вариантами полимераз, что указывает на высокую специфичность амплификации.

Полимераза LongAmp, которая в настоящей работе продемонстрировала высокую эффективность, характеризуется относительно невысокой точностью амплификации, по заявлениям производителя (“NEB”) превышающей точность Taq-полимеразы в 2 раза. Низкая точность накладывает ограничения на применимость этой полимеразы для таких приложений, как например клонирование длинных последовательностей при создании генетических конструкций. Полимераза Platinum SuperFi II, которая характеризуется намного более высокой точностью синтеза, в данной работе проявила способность эффективно синтезировать различные длинные ампликоны. Эта полимераз успешно применялась для амплификации длинных последовательностей различного происхождения [30–36]. Недостатком полимеразы Platinum SuperFi II является ее высокая стоимость, которая значительно превышает стоимость большинства коммерчески доступных ДНК-полимераз, в том числе всех ферментов, исследованных в этой работе.

Ни одна из исследованных в этой работе ДНК-полимераз не обеспечивала эффективную амплификацию всех целевых фрагментов ДНК. В то же время, практически любой из представленных в данном исследовании фрагментов ДНК или кДНК, в том числе длинных (≈5000 п.о. и более), мог быть эффективно амплифицирован с использованием по крайней мере одного варианта ДНК-полимеразы. Исходя из этого, при воз-

никновении перед исследователем необходимости в амплификации длинных фрагментов ДНК, в особенности со сложных матриц, к которым относится геномная ДНК многих растений, можно рекомендовать экспериментальную валидацию нескольких вариантов ДНК-полимераз как эффективный способ добиться удовлетворительной амплификации целевого участка генома.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 21-76-10050 с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Биотехнология” Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии (соглашение RFMEFI62114×0003).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karunanathie H., Kee P.S., Ng S.F., Kennedy M.A., Chua E.W. // *Biochimie*. 2022. V. 197. P. 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.02.009>
2. Knierim E., Lucke B., Schwarz J.M., Schuelke M., See-
low D. // *PloS One*. 2011. V. 6. № 11. P. e28240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028240>
3. Qiao W., Yang Y., Sebra R., Mendiratta G., Gaedigk A., Desnick R.J., Scott S.A. // *Hum. Mutat.* 2016. V. 37. № 3. P. 315–323. <https://doi.org/10.1002/humu.22936>
4. Martijn J., Lind A.E., Schön M.E., Spiertz I., Juzokaite L., Bunikis I. et al. // *Environ. Microbiol.* 2019. V. 21. № 7. P. 2485–2498. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14636>
5. Karst S.M., Ziels R.M., Kirkegaard R.H., Sørensen E.A., McDonald D., Zhu Q., Knight R., Albertsen, M. // *Nat. Methods*. 2021. V. 18. № 2. P. 165–169. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01041-y>
6. Brait N., Küleççi B., Goerzer I. // *BMC Genomics*. 2022. V. 23. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08272-z>
7. Briscoe A.G., Goodacre S., Masta S.E., Taylor M.I., Arnedo M.A., Penney D., Kenny J., Creer S. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. e62404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062404>
8. Jia H., Guo Y., Zhao W., Wang K. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. № 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep05737>
9. Ozaki Y., Suzuki S., Shigenari A., Okudaira Y., Kikkawa E., Oka A. et al. // *Tissue Antigens*. 2014. V. 83. № 1. P. 10–16. <https://doi.org/10.1111/tan.12258>
10. Deiner K., Renshaw M.A., Li Y., Olds B.P., Lodge D.M., Pfrender M.E. // *Methods Ecol. Evol.* 2017. V. 8. № 12. P. 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12836>
11. Togi S., Ura H., Niida Y. Optimization and Validation of Multimodular // *J. Mol. Diagn.* 2021. V. 23. № 4. P. 424–446. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.12.009>
12. Günther S., Sommer G., Von Breunig F., Iwanska A., Kallinina T., Sterneck M., Will H. // *J. Clin. Microbiol.* 1998. V. 36. № 2. P. 531–538. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.531-538.1998>
13. Trémeaux P., Caporossi A., Ramière C., Santoni E., Tarbouriech N., Thélu M.A. et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2016. V. 22. № 5. P. 460–e1. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.015>
14. Joffret M.L., Polston P.M., Razafindratsimandresy R., Bessaud M., Heraud J.M., Delpeyroux F. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2339. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02339>
15. Isaacs S.R., Kim K.W., Cheng J.X., Bull R.A., Stelzer-Braid S., Luciani F. et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30322-y>
16. Shagin D.A., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Matz M.V. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 18. P. e23–i. <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.e23-i>
17. Zhao Z., Xie X., Liu W., Huang J., Tan J., Yu H., Zong W. et al. // *Mol. Plant.* 2022. V. 15. № 4. P. 620–629. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.12.018>
18. Ignatov K.B., Kramarov V.M. // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. V. 74. № 5. P. 557–561. <https://doi.org/10.1134/S0006297909050113>
19. Cheng S., Fockler C., Barnes W.M., Higuchi R. // *PNAS*. 1994. V. 91. № 12. P. 5695–5699. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5695>
20. Waggott W. // *Humana Press*. 1998. V. 16. P. 81–91. <https://doi.org/10.1385/0-89603-499-2:81>
21. Kasajima I. // *Trends Res.* 2018. V. 1. P. 1–2. <https://doi.org/10.15761/TR.1000115>
22. Singh R.P., Singh M., King R.R. // *J. Virol. Methods*. 1998. V. 74. № 2. P. 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00092-5)
23. Singh R.P., Nie X., Singh M., Coffin R., Duplessis P. // *J. Virol. Methods*. 2002. V. 99. № 1–2. P. 123–131. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00391-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00391-3)
24. Valcarcel J., Reilly K., Gaffney M., O'Brien N.M. // *Potato Res.* 2015. V. 58. № 3. P. 221–244. <https://doi.org/10.1007/s11540-015-9299-z>
25. Анисимова И.Н., Алматыева Н.В., Абдуллаев П.А., Карабицина Ю.И., Кузнецова Е.Б. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле. / Ред. Радченко Е.Е.: Методические указания ВИР. СПб: ВИР, 2018. 47 с. <https://doi.org/10.30901/978-5-905954-81-8>
26. Moury B., Charron C., Janzac B., Simon V., Gallois J.L., Palloix A., Caranta C. // *Infect. Genet. Evol.* 2014. V. 27. P. 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.024>
27. Luciola A., Tavazza R., Baima S., Fatyol K., Burgyan J., Tavazza M. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873930>
28. Quenouille J., Vassilakos N., Moury B. // *Plant Pathol.* 2013. V. 14. № 5. P. 439–452. <https://doi.org/10.1111/mpp.12024>

29. Suzuki Y., Sugano S. // *Genomics Protocols*. 2001. V. 175. P. 143–153. <https://doi.org/10.1385/1-59259-235-X:143>
30. Ling A.K., Munro M., Chaudhary N., Li C., Berru M., Wu B., Durocher D., Martin A. // *EMBO Rep*. 2020. V. 21. № 8. P. e49823. <https://doi.org/10.15252/embr.201949823>
31. Xie X., Muruato A., Lokugamage K.G., Narayanan K., Zhang X., Zou J., Liu J. et al. // *Cell Host Microbe*. 2020. V. 27. № 5. P. 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.004>
32. Sannier G., Dube M., Dufour C., Richard C., Brassard N., Delgado G.G., Pagliuzza A., Baxter A.E., Niessl J., Brunet-Ratnasingham E., Charlebois R., Routy B., Routy J.P., Fromentin R., Chomont N., Kaufmann D.E. // *Cell Rep*. 2021. V. 36. № 9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109643>
33. Keraite I., Becker P., Canevazzi D., Frias-López C., Dabad M., Tonda-Hernandez R., Paramonov I., Ing-ham M.J., Brun-Heath I., Leno J., Abulí A., Garcia-Arumí E., Heath S.C., Gut M., Gut I.G. // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33530-3>
34. Maniego J., Pesko B., Habershon-Butcher J., Hincks P., Taylor P., Tozaki T., Ohnuma A., Stewart G., Proudman C., Ryder E. // *Drug Testing and Analysis*. 2022. V. 14. № 8. P. 1429–1437. <https://doi.org/10.1002/dta.3267>
35. Tasca F., Brescia M., Wang Q., Liu J., Janssen J.M., Szuhai K., Gonçalves M.A. // *Nucleic Acids Res*. 2022. V. 50. № 13. P. 7761–7782. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac567>
36. Vincendeau E., Wei W., Zhang X., Planchais C., Yu W., Lenden-Hasse H., Cokelaer T., da Fonseca J.P., Mouquet H., Adams D.J., Alt F.W., Jackson S.P., Balmus G., Lescale C., Deriano L. // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31287-3>

The Efficiency of Various DNA Polymerases for Amplification of Long Sequences from Genomic DNA and cDNA of Cultivated Potato

A. D. Antipov^a and N. E. Zlobin^{a, *}

^aAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Timiryazevskaya, 42, Moscow, 127550 Russia

*e-mail: stresslab@yandex.ru

Amplification of long fragments from complex templates, such as eukaryotic genomic DNA, is considered a difficult task for most DNA polymerases. In this research, 6 variants of DNA polymerases were used to amplify full-length sequences from the genomic DNA of *Solanum tuberosum* genes encoding translation initiation factors of the eIF4E family, as well as for the synthesis of fragments of the potato Y virus genome from cDNA of potato plants infected by this virus. It was found that the efficiency of amplification by various DNA polymerases generally decreased with increasing length of the amplicons. LongAmp and Platinum SuperFi II polymerases demonstrated the highest efficiency in the synthesis of long fragments, which made it possible to synthesize PCR products with a length of more than 10,000 base pairs with high efficiency. The lowest efficiency was demonstrated by Encyclo polymerase. None of the DNA polymerases provided efficient amplification of all the studied DNA fragments. At the same time, any of the studied DNA fragments could be effectively amplified using at least one DNA polymerase variant. Thus, the choice of DNA polymerase was of key importance for the efficiency of the synthesis of a desired PCR product.

Keywords: polymerase chain reaction, long-range PCR, DNA polymerase

УДК 582.982+547.814.5+612.344

АЦИЛИРОВАННЫЕ ФЛАВОНОИДЫ ИЗ *Cucumis sativus* ИНГИБИРУЮТ АКТИВНОСТЬ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Д. Н. Оленников¹, *, Н. И. Кащенко¹

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

*e-mail: olennikovdn@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

Нарушения липидного обмена представляют собой большую группу заболеваний, для лечения которых применяются различные стратегии, в том числе использование ингибиторов панкреатической липазы, что позволяет снизить поступление и адсорбцию липидов. В настоящем исследовании впервые показано, что отходы сельскохозяйственного культивирования *Cucumis sativus* (огурец посевной) могут быть источником для получения эффективных ингибиторов липазы. В результате хроматографического разделения из листьев *C. sativus* были выделены семь ацилированных флавоноидов, в том числе три новых производных изовитексина, охарактеризованных по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как изовитексин-2"-*O*-глюкозид-6"-*O*-ферулат (1), изовитексин-2"-*O*-глюкозид-6"-*O*-*n*-кумарат (2) и изовитексин-2"-*O*-(6"-*O*-ферулоил)-глюкозид-6"-*O*-ферулат (3). Результаты количественной ВЭЖХ показали, что суммарное содержание ацилированных флавоноидов в листьях российских сортов *C. sativus* составило 3.78–7.44 мг/г. Выделенные соединения продемонстрировали способность к ингибированию панкреатической липазы человека, причем эффективность флавоноида 3 оказалась наибольшей и превышала активность препарата сравнения (орлистата). Проведенные исследования показали, что листья *C. sativus* можно использовать для выделения биологически активных фитоконпонентов, обладающих гипополипидемической активностью.

Ключевые слова: *Cucumis sativus*, панкреатическая липаза человека, ингибиторы, ацилированные флавоноиды, изовитексин

DOI: 10.31857/S0555109923040104, EDN: QZMGOJ

В России в последние пять лет было введено в эксплуатацию 1.5 тыс. гектаров тепличных комплексов, причем в 2021 г. общая площадь подобных хозяйств увеличилась на 10% [1]. Растущее количество подобных предприятий стремительно увеличивает массу растительных отходов – неплодового вторичного сырья (стебли, листья, корни), образующегося в результате вегетации растений и неиспользуемого в коммерческих целях. Основным путем утилизации зеленых отходов является компостирование, хотя биомасса растений может быть источником для получения хозяйственно-ценных продуктов, обладающих добавочной коммерческой ценностью [2].

Основной сельскохозяйственной культурой, включенной в тепличный севооборот, является огурец посевной (*Cucumis sativus* L., семейство Тыквенные) [3]. Биологической особенностью данной культуры является образование удлиненных побегов (стебли, листья). Масса побегов может достигать до 50–60% от массы плодов, что, по предварительной оценке, может составлять до

1 млн т в год [4]. Несмотря на широкую включенность плодов *C. sativus* в хозяйственную деятельность человека в качестве продукта питания, научные исследования зеленых побегов данного вида ограничены лишь общей информацией о химическом составе [5], в то время как сведения о детальном составе метаболитов и потенциальной биологической активности отсутствуют [6]. Ранее было установлено, что экстракты листьев *C. sativus* и некоторые фенольные соединения в их составе обладают способностью ингибировать активность панкреатической липазы человека [7]. Данный пищеварительный фермент участвует в гидролизе эфирных связей триглицеридов и образовании свободных жирных кислот [8], при избыточном поступлении которых развивается ряд гиперлипидемических патологических состояний, приводящих к формированию атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [9]. Применение ингибиторов липазы нормализует метаболизм липидов и снижает негативные последствия гиперлипидемии. К числу эффективных ингибито-

ров липазы относятся различные соединения [10], в том числе природного происхождения, среди которых особого внимания заслуживают флавоноиды, инактивирующие липазу и оказывающие эффект снижения концентрации липидов [11]. Учитывая объемы производства *C. sativus*, данная культура может стать перспективным сырьем для фармацевтической промышленности, в частности для получения фитопрепаратов с гипополипдемической активностью.

Цель работы — исследование состава флавоноидов листьев *C. sativus*, выделение основных соединений и определение их ингибиторного влияния на активность панкреатической липазы человека.

МЕТОДИКА

Условия эксперимента. Листья *C. sativus* (сорта Алфавит F1, Амур F1, Дачный F1, Динамит F1, Кураж F1, Нежинский, Сибирская гирлянда F1, Сибирский экспресс F1, Стрелец F1, Торнадо F1) были собраны в экспериментальном тепличном хозяйстве Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (Республика Бурятия, Россия) и высушены при 45°C до влажности ≤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). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (“ОКБ Спектр”, Россия). Масс-спектры регистрировали на ТQ-масс-спектрометре LCMS-8050 (“Shimadzu”, Япония) [12], спектры ЯМР — на спектрометре VXR 500S (“Varian”, США). Препаративную ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (“Shimadzu”), снабженном колонкой Shim-pak PREP-ODS (20 мм × 250 мм × 15 мкм) и фотодиодным детектором SPD-M30A (“Shimadzu”), при скорости — 1.0 мл/мин и температуре колонки 20°C.

Экстракция и выделение соединений из листьев *C. sativus*. Измельченное сырье (сорт Сибирский экспресс F1; 5 кг) экстрагировали 70%-ным изопропанолом (1 : 25, 70°C) дважды, после чего экстракт фильтровали через целлюлозный фильтр и концентрировали в вакууме досуха (1.4 кг). Далее экстракт разделяли с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) на полиамиде (10 кг), который промывали водой (ТФЭ-1, 420 г), 70%-ным этанолом (ТФЭ-2, 150 г) и 0.5%-ным раствором аммиака в 90%-ном этаноле (ТФЭ-3, 170 г).

Проверка способности ингибировать активность панкреатической липазы человека спектрофотометрическим методом, как описано в работе [13] показала, что фракция ТФЭ-3 более активная (IC_{50} 63.22 мкг/мл), чем ТФЭ-1 (IC_{50} > 500 мкг/мл)

и ТФЭ-2 (IC_{50} 158.63 мкг/мл), поэтому дальнейшие исследования были проведены с ТФЭ-3. Для выделения индивидуальных соединений ТФЭ-3 (160 г) хроматографировали методом флэш-хроматографии на Сефадексе LH-20 (колонка 2 × 90 см, элюент этанол—вода 80 : 20 — фракция А, 70 : 30 — фракция В, 40 : 60 — фракция С), далее фракции В и С разделяли на ОФ- SiO_2 (колонка 2 × 40 см, элюент вода—ацетонитрил 95 : 5, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50) и SiO_2 (3 × 40 см, этилацетат—этанол 100 : 0, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40).

Для разделения близко элюируемых соединений применяли препаративную ВЭЖХ, используя воду (I) и ацетонитрил (II) в качестве элюентов. Программа элюирования (время элюирования, мин; % ацетонитрила в воде) — 0–50 мин 5–27%, 50–100 мин 27–40%, 100–150 мин 40–52%. В результате были выделены изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-ферулат (630 мг), изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-*n*-кумарат (160 мг), изовитексин-2"-О-(6"-О-ферулоил)-глюкозид-6"-О-ферулат (340 мг), и известные соединения изовитексин-4'-О-глюкозид-2"-О-(6"-О-ферулоил)-глюкозид (1.6 г), изовитексин-4'-О-глюкозид-2"-О-(6"-О-*n*-кумароил)-глюкозид (8.3 г), изовитексин-2"-О-(6"-О-ферулоил)-глюкозид (810 мг) и изовитексин-2"-О-(6"-О-*n*-кумароил)-глюкозид (430 мг), идентифицированные по данным УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии [14, 15].

Изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-ферулат (1). Общая формула — $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 273, 292, 322. HR-ESI-MS, m/z : 769.5211 [M–H][–] (расч. 769.6776 для $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{O}_{18}$ [M–H][–]). ESI-MS, m/z (%): 769 [M–H][–] (18), 607 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$][–] (31), 593 [(M–H)– $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$][–] (63), 431 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ – $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$][–] (100), 341 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ – $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ –90][–] (15), 311 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ – $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ –120][–] (8). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, ДМСO-*d*₆, 330 К, δ_{H} , м.д.): табл. 1. Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, ДМСO-*d*₆, 330 К, δ_{C} , м.д.): табл. 1.

Изовитексин-2"-О-глюкозид-6"-О-*n*-кумарат (2). Общая формула — $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{O}_{17}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 270, 290, 319. HR-ESI-MS, m/z : 739.3731 [M–H][–] (расч. 739.6520 для $\text{C}_{36}\text{H}_{35}\text{O}_{17}$ [M–H][–]). ESI-MS, m/z (%): 739 [M–H][–] (12), 593 [(M–H)– $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$][–] (58), 577 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$][–] (17), 431 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ – $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$][–] (100), 341 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ – $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$ –90][–] (19), 311 [(M–H)– $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ – $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$ –120][–] (15). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, ДМСO-*d*₆, 330 К, δ_{H} , м.д.): табл. 1. Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, ДМСO-*d*₆, 330 К, δ_{C} , м.д.): табл. 1.

Изовитексин-2"-О-(6"-О-ферулоил)-глюкозид-6"-О-ферулат (3). Общая формула — $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{O}_{21}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 272, 292, 321. HR-ESI-MS, m/z : 945.7209 [M–H][–] (расч. 945.8470 для

Таблица 1. Сигналы спектров ЯМР ^1H (500 МГц, ДМСО- d_6 , 330 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 МГц, ДМСО- d_6 , 330 К, δ_{C} , м.д.) соединений 1–3

Фрагмент*	С-атом	1		2		3	
		δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
Апигенин	2	–	164.0	–	164.2	–	164.1
	3	6.58 (1H, c)	103.2	6.56 (1H, c)	103.0	6.54 (1H, c)	103.1
	4	–	182.3	–	182.1	–	182.2
	5	–	160.4	–	160.2	–	160.0
	6	–	110.5	–	110.4	–	110.7
	7	–	161.5	–	161.6	–	161.4
	8	6.41 (1H, c)	104.7	6.42 (1H, c)	104.5	6.40 (1H, c)	104.6
	9	–	154.2	–	154.3	–	154.6
	10	–	105.1	–	105.3	–	105.5
	1'	–	122.3	–	122.0	–	122.5
	2',6'	7.88 (2H, д, $J = 9.0$)	129.4	7.85 (2H, д, $J = 9.1$)	129.2	7.83 (2H, д, $J = 9.0$)	129.5
	3',5'	6.92 (2H, д, $J = 9.0$)	115.4	6.90 (2H, д, $J = 9.1$)	115.2	6.91 (2H, д, $J = 9.0$)	115.6
	4'	–	161.2	–	161.0	–	161.1
6-C-Glcp***	1''	4.89 (1H, д, $J = 9.2$)	72.1	4.87 (1H, д, $J = 9.0$)	72.3	4.82 (1H, д, $J = 9.5$)	72.0
	2''	4.48 (1H, м)	80.4	4.45 (1H, м)	80.2	4.49 (1H, м)	80.5
	3''	3.58 (1H, м)	76.8	3.57 (1H, м)	76.6	3.50 (1H, м)	76.7
	4''	3.25–3.29 (2H, м)	70.5	3.22–3.25 (2H, м)	70.7	3.20–3.23 (2H, м)	70.4
	5''	–	72.4	–	72.0	–	72.5
	6''	4.10 (1H, м) 4.38 (1H, м)	63.8	4.08 (1H, м) 4.35 (1H, м)	63.5	4.12 (1H, м) 4.32 (1H, м)	63.9
2''-O-Glcp***	1'''	4.32 (1H, д, $J = 7.0$)	104.9	4.33 (1H, д, $J = 7.1$)	104.5	4.30 (1H, д, $J = 7.3$)	105.2
	2'''	3.18–3.24 (4H, м)	74.2	3.11–3.20 (4H, м)	74.0	2.98–3.18 (4H, м)	74.2
	3'''	–	78.1	–	78.4	–	78.0
	4'''	–	70.2	–	70.2	–	69.5
	5'''	–	77.2	–	77.0	–	73.4
	6'''	3.30 (1H, м) 3.72 (1H, м)	61.2	3.28 (1H, м) 3.74 (1H, м)	61.5	4.10 (1H, м) 4.38 (1H, м)	64.7
6''-O-Fer**	1''''	–	125.0	–	–	–	125.2 ^ж
	2''''	7.05 (1H, д, $J = 2.0$)	110.0	–	–	7.02 (1H, д, $J = 2.0$) ^а	109.8 ^з
	3''''	–	147.5	–	–	–	147.2 ^и
	4''''	–	149.1	–	–	–	149.3 ^к
	5''''	6.67 (1H, д, $J = 8.0$)	115.0	–	–	6.65 (1H, д, $J = 8.1$) ^б	115.2 ^л
	6''''	6.79 (1H, дд, $J = 2.0, 8.0$)	123.6	–	–	6.80 (1H, дд, $J = 2.1, 8.1$) ^в	123.2 ^м
	7''''	7.20 (1H, д, $J = 16.0$)	144.2	–	–	7.18 (1H, д, $J = 16.0$) ^г	144.0 ^н
	8''''	6.02 (1H, д, $J = 16.0$)	114.0	–	–	6.00 (1H, д, $J = 16.0$) ^д	114.1 ^о
	9''''	–	166.0	–	–	–	165.9
6''-O-pCou*	3''''-OCH ₃	3.85 (3H, c)	55.2	–	–	3.83 (3H, c) ^е	55.0 ^п
	1''''	–	–	–	125.2	–	–
	2''''	–	–	7.30 (2H, д, $J = 8.5$)	130.2	–	–
	3''''	–	–	6.70 (2H, д, $J = 8.5$)	115.4	–	–
	4''''	–	–	–	159.6	–	–
7''''	–	–	7.18 (1H, д, $J = 15.9$)	144.0	–	–	

Таблица 1. Окончание

Фрагмент*	С-атом	1		2		3	
		δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
6'''-O-Fer**	8'''			6.05 (1H, д, $J = 15.9$)	114.1		
	9'''			–	166.2		
	1''''					–	125.4 ^ж
	2''''					7.04 (1H, д, $J = 1.9$) ^а	110.1 ^з
	3''''					–	147.4 ^и
	4''''					–	149.5 ^к
	5''''					6.68 (1H, д, $J = 8.0$) ^б	115.4 ^п
	6''''					6.82 (1H, дд, $J = 1.9, 8.0$) ^в	123.4 ^м
	7''''					7.22 (1H, д, $J = 15.9$) ^г	144.3 ^и
	8''''					6.04 (1H, д, $J = 15.9$) ^д	114.2 ^о
	9''''					–	166.1
3''''-OCH ₃					3.84 (3H, с) ^е	55.3 ^п	

* pCoU – *n*-кумароил, ** Fer – ферулоил, *** Glcp – глюкопираноза. Сигналы, отмеченные одинаковыми символами (а–п) могут считаться взаимозаменяемыми.

C₄₇H₄₅O₂₁ [M–H][–]. ESI-MS, m/z (%): 945 [M–H][–] (28), 679 [(M–H)–C₁₀H₈O₃][–] (21), 607 [(M–H)–C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅][–] (11), 593 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃][–] (42), 431 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅][–] (100), 341 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅–90][–] (9), 311 [(M–H)–2C₁₀H₈O₃–C₆H₁₀O₅–120][–] (6). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, ДМСО-*d*₆, 330 К, δ_H , м.д.): табл. 1. Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, ДМСО-*d*₆, 330 К, δ_C , м.д.): табл. 1.

Гидролиз. Кислотный гидролиз проводили в 2 М ТФУ (5 мл на 5 мг соединения) при 100°C 2 ч, после чего кислоту удаляли в вакууме в присутствии метанола и разделяли сухой остаток на полиамиде (3 г, картриджи “Capital Analytical”, Великобритания), который промывали водой (100 мл, элюат I), метанолом (150 мл, элюат II) и 0.5%-ным аммиаком в метаноле (150 мл, элюат III). В элюате I определяли присутствие моносахаридов после реакции с 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном методом ВЭЖХ, а также после восстановительного аминирования с L-триптофаном для определения принадлежности к D/L-ряду [16]. Инкубацию с 0.3%-ным NaOH проводили, как описано ранее, а для ферментативного гидролиза применяли β -глюкозидазу (3.2.1.21, 30 ед./мг, “Sigma-Aldrich”); 2 ед. в 500 мкл 100 мМ фосфатного буфера, pH 5.0), с которой инкубировали соединения, используя метод [17].

Биологическая активность. Влияние фракций и индивидуальных соединений на активность липазы изучали спектрофотометрическим методом [13] с использованием панкреатической липазы человека (3.1.1.3, 50 ед./мг; “Lee Biosolutions”, США),

используя в качестве субстратов *n*-нитрофенил-бутират, *n*-нитрофенил-лаурат и *n*-нитрофенил-стеарат (все “Sigma-Aldrich”). Орлистат (тетрагидролипостатин, “Sigma-Aldrich”) использовали в качестве положительного контроля. Ингибиторная активность выражалась величиной IC₅₀ (концентрация, вызывающая 50%-ное ингибирование активности фермента) в мкг/мл, которую определяли графически после построения зависимости ингибиторной активности от концентрации.

Тест на летальность. В тесте применяли цисты *Artemia salina* (“Арсал”, Россия), которые инкубировали в искусственной морской воде (“Sigma-Aldrich”) с исследуемым веществом (20–2000 мкг/мл) или 0.9%-ным раствором NaCl (контроль), как описано ранее [18].

Статистический анализ. Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значимость различий средних определяли с помощью многогранного теста Дункана. Отличия при $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракт листьев *C. sativus* фракционировали с применением твердофазной экстракции (ТФЭ) на полиамиде, в результате чего получены фракции ТФЭ-1–ТФЭ-3, из которых ТФЭ-3 оказывала наибольшее ингибиторное влияние на активность панкреатической липазы человека. Далее ТФЭ-3 разделяли методом флэш-хроматографии на Сефадексе LH-20, обращено- и нормально-фазовом силикагеле и препаративной ВЭЖХ, что привело

к выделению соединений **1–7**, строение которых было изучено с использованием данных УФ, ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии и химических превращений (рис. 1). Четыре соединения оказались известными природными флавоноидами и производными С-гликозида изовитексина (апигенин-С-гликозида), включая изовитексин-4'-О-гликозид-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид (**4**), изовитексин-4'-О-гликозид-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-гликозид (**5**), изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид (**6**) и изовитексин-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-гликозид (**7**) (рис. 2). Ранее эти соединения были обнаружены в листьях *C. sativus*, инфицированных *Podospaera fuliginea* – патогеном, вызывающим мучнистую росу у видов *Cucurbitaceae* [15], и впервые описаны в тканях здоровых растений.

Соединение **1** после гидролиза с 2 М ТФУ распадалось на изовитексин, феруловую кислоту и D-глюкозу и обладало УФ-спектром, типичным для С,О-гликозил-апигенинов, ацилированных гидроксикоричными кислотами [14]. Инкубация с 0.3%-ным NaOH приводила к образованию изовитексин-2"-О-гликозида, что возможно при ацилировании углеводной части молекулы. Фрагментация в масс-спектре отрицательной ионизации у **1** была близка к таковой изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозида (**6**) [15], однако для **1** наблюдалось образование фрагмента с m/z 607, вызванного удалением из депротонированного иона гексозы, что возможно при терминальном расположении последней. Данный факт был подтвержден результатами ферментативного гидролиза **1** с β -гликозидазой, приводившего к формированию изовитексин-6"-О-ферулата [15], в то время как обработка **6** данным ферментом не приводила к изменению структуры. Сравнительный анализ спектров ЯМР **1** и изовитексин-2"-О-гликозида показал их сходство, кроме присутствия дополнительных сигналов, принадлежащих фрагменту *транс*-феруловой кислоты (табл. 1). Расположение ферулоильного фрагмента у атома С-6" 6-С-связанной глюкозы было подтверждено данными спектра НМВС, в котором отмечены корреляции между сигналами протонов Н-6" (δ_H 4.10, 4.38) и углерода карбонильной группы С-9''' (δ_C 166.0). Таким образом, строение соединения **1** было определено как апигенин-6-С-(2"-О- β -D-глюкопиранозил-6"-О-ферулоил)- β -D-глюкопиранозид (изовитексин-2"-О-гликозид-6"-О-ферулат), изомером которого является изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид, выделенный ранее из *C. sativus* [15]. Соединение **2** было близко по строению к **1**, но содержало фрагмент *n*-кумаровой кислоты, о чем свидетельствовали результаты кислотного и щелочного гидролиза, УФ, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии. Это позволило установить, что **2** является апигенин-6-С-(2"-О- β -D-глюкопиранозил-6"-О-*n*-кумароил)- β -

D-глюкопиранозидом (изовитексин-2"-О-гликозид-6"-О-*n*-кумарат). Близким по строению к **2** является изовитексин-2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)-гликозид так же найденный в *C. sativus* [15].

Данные масс-спектрометрии указывали, что молекулярная масса соединения **3** была на 176 а.е.м. больше ($C_{47}H_{46}O_{21}$), чем у **1** ($C_{37}H_{38}O_{18}$). Причем, как и в случае с **1** после кислотного гидролиза **3** наблюдалось образование изовитексина, феруловой кислоты и D-глюкозы, но в масс-спектре соединения обнаружены ионы с m/z 769 и 593, которые свидетельствовали об удалении двух ферулоильных фрагментов. В спектре ЯМР ^{13}C отмечены слабopольные сдвиги сигналов С-6" (δ_C 61.2 \rightarrow 63.9) и С-6''' (δ_C 60.9 \rightarrow 64.7) глюкозных фрагментов относительно таковых у изовитексин-2"-О-гликозида [19], а в спектре НМВС выявлены корреляции между сигналами протонов Н-6" (δ_H 4.12, 4.32) и Н-6''' (δ_H 4.10, 4.38) и углеродов карбонильных групп С-9''' (δ_C 165.9) и С-9'''' (δ_C 166.1) соответственно. Выявленные особенности указывали на то, что соединение **3** представляло собой изовитексин-2"-О-(6'''-О-ферулоил)-гликозид-6"-О-ферулат или апигенин-6-С-{2"-О-(6'''-О-*n*-кумароил)- β -D-глюкопиранозил-6"-О-*n*-кумароил}- β -D-глюкопиранозид.

Результаты количественного анализа листьев 10 российских сортов *C. sativus* возрастом 14–16 недель показали, что суммарное содержание соединений **1–7** может варьировать от 3.78 мг/г (сорт Амур F1) до 7.44 мг/г (сорт Дачный F1) (табл. 2). Различные сорта демонстрировали разную способность к накоплению отдельных соединений, а концентрация доминирующих соединений составила 0.30–5.34 мг/г для **3**, 0.75–2.53 мг/г для **4** и 1.73–4.19 мг/г для **5**. Литературные данные о содержании отдельных соединений в листьях *C. sativus* отсутствуют, но известно, что суммарная концентрация данной группы соединений в сортах, выращиваемых в других странах, ниже и составляет до 1 мг/г в Китае [20], до 1.46 мг/г в Индонезии [21] и до 2 мг/г в США [22].

Исследование биологической активности выделенных соединений показало, что соединения **1–7** оказывали ингибиторное действие на активность панкреатической липазы человека (табл. 3). В качестве субстратов были использованы эфиры *n*-нитробензола с различной длиной жирной цепи, в том числе бутират, лаурат и стеарат. Вещество сравнения орлистат вызывало наибольшее ингибирование гидролиза короткоцепочечного субстрата *n*-нитрофенил бутирата ($IC_{50} = 0.012$ мкг/мл). В данных условиях максимальную активность проявлял флавоноид **3** ($IC_{50} = 5.69$ мкг/мл), в то время как другие соединения были менее эффективными (IC_{50} 11.28–90.83 мкг/мл). При применении длинноцепочечного *n*-нитрофенил стеарата в качестве субстрата ингибиторная активность орли-

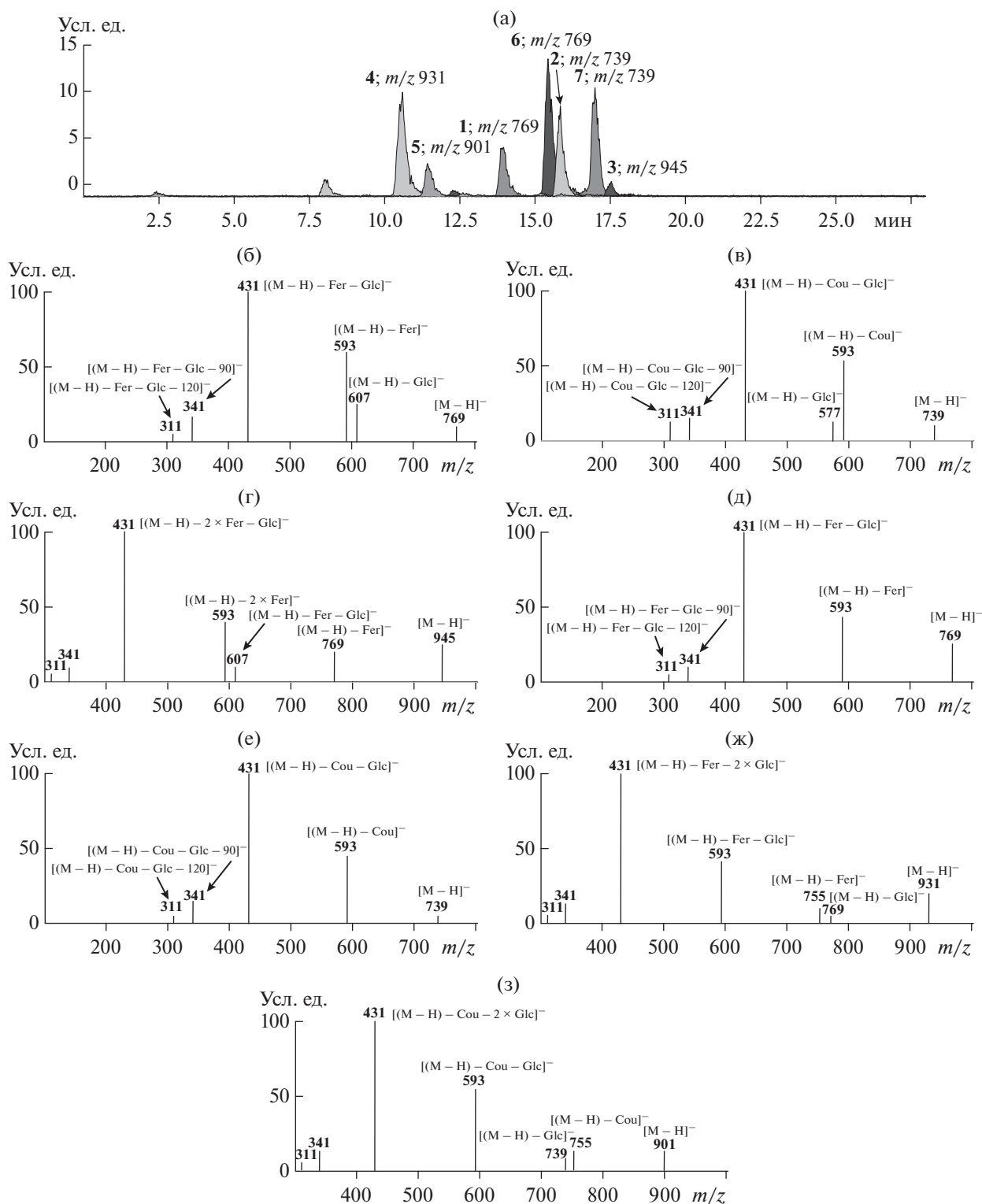


Рис. 1. Хромотограма (ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием, отрицательная ионизация, режим регистрации выделенных ионов с m/z 739, 769, 901, 931, 945) фракции ТФЭ-3 листьев *Cucumis sativus* (а) и масс-спектры соединений 1 (б), 2 (в), 3 (г), 4 (д), 5 (е), 6 (ж) и 7 (з). Числами над пиками указан номер соединения и величина m/z депротонированного иона.

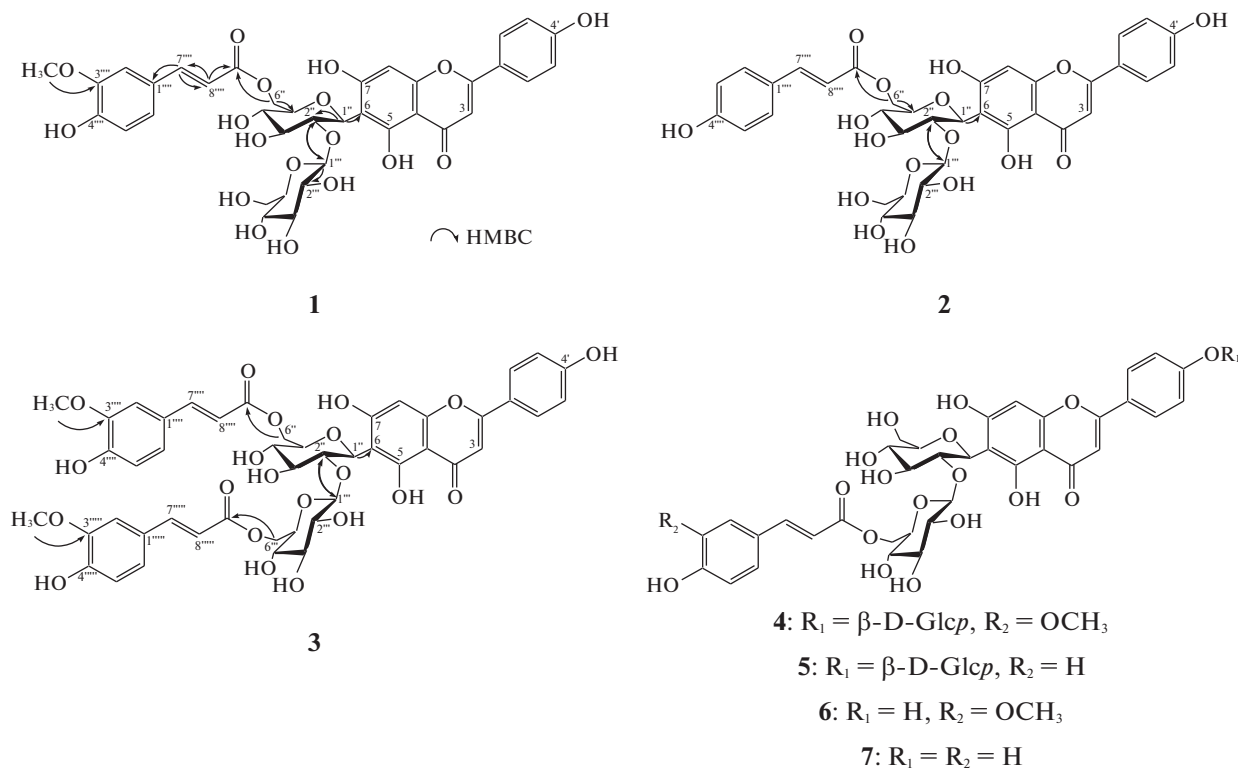


Рис. 2. Строение соединений 1–7, выделенных из листьев *C. sativus*.

стата снижалась ($IC_{50} = 3.14$ мкг/мл), а активность флавоноидов повышалась, причем эффективность **3** ($IC_{50} = 1.62$ мкг/мл), **6** ($IC_{50} = 2.72$ мкг/мл) и **1** ($IC_{50} = 2.94$ мкг/мл) превышала таковую вещества сравнения. В случае с субстратом со средней длиной жирной цепи флавоноиды **1–3**, **6**, **7** ингибировали активность липазы менее эффективно (IC_{50} 2.83–7.52 мкг/мл), чем орлистат ($IC_{50} = 0.53$ мкг/мл). Пищевые триглицериды в большинстве случаев пред-

ставляют собой эфиры глицерина и жирных кислот с длиной цепи от 14 до 22 атомов углерода, то есть от средне- до длинноцепочечных [23]. В этой связи важное значение имеет тот факт, что флавоноиды *C. sativus* могли оказывать ингибиторное влияние на гидролиз именно этой группы глицеридов.

В экспериментах с *Artemia salina* было установлено, что орлистат вызывал 50% гибель организмов при концентрации 125 мкг/мл, в то время как

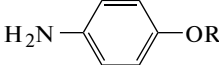
Таблица 2. Содержание соединений 1–7 и их суммы (Σ_{1-7}) в листьях российских сортов *C. sativus*, (мг/г сухого сырья)*

Сорт	Соединение							Σ_{1-7}
	1	2	3	4	5	6	7	
Алфавит F1	0.18	0.02	0.30	1.84	1.73	0.02	0.04	4.13
Амур F1	0.07	Сл.	0.29	1.25	2.17	Сл.	Сл.	3.78
Дачный F1	0.35	0.05	0.82	2.18	4.01	0.02	0.01	7.44
Динамит F1	0.44	0.02	0.87	2.02	3.54	0.04	Сл.	6.93
Кураж F1	0.10	Сл.	0.44	1.14	2.83	Сл.	0.02	4.53
Нежинский	1.10	0.78	5.34	Сл.	Сл.	Сл.	Сл.	7.22
Сибирская гирлянда F1	0.23	Сл.	0.44	2.53	2.93	Сл.	0.01	6.14
Сибирский экспресс F1	0.07	0.01	0.56	1.19	4.19	0.07	0.03	6.12
Стрелец F1	0.15	0.01	0.89	1.89	2.47	0.01	Сл.	5.42
Торнадо F1	0.06	0.15	0.51	0.75	3.43	Сл.	0.02	4.92

* Сл. – <0.01 мг/г.

Таблица 3. Ингибирование активности панкреатической липазы человека соединениями 1–7 и орлистом в присутствии трех субстратов, IC₅₀, мкг/мл ± S.D.

Соединение	IC ₅₀ , мкг/мл		
	<i>n</i> -Нитрофенил бутират, CH ₃ (CH ₂) ₂ CO	<i>n</i> -Нитрофенил лаурат, CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO	<i>n</i> -Нитрофенил стеарат, CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO
1	11.28 ± 0.46 ^c	4.37 ± 0.17 ^c	2.94 ± 0.12 ^b
2	14.06 ± 0.57 ^d	7.52 ± 0.30 ^d	3.18 ± 0.14 ^{bc}
3	5.69 ± 0.23 ^b	2.83 ± 0.11 ^b	1.62 ± 0.06 ^a
4	>100	>100	>100
5	>100	>100	>100
6	12.86 ± 0.51 ^c	4.35 ± 0.17 ^c	2.72 ± 0.10 ^b
7	14.83 ± 0.59 ^d	7.43 ± 0.29 ^d	3.26 ± 0.14 ^c
Орлистат	0.012 ± 0.001 ^a	0.53 ± 0.02 ^a	3.14 ± 0.12 ^{bc}

Примечание. Общая структура субстрата . Значения с разными надстрочными символами (^{a–d}) указывают на статистически значимые различия между группами при $p < 0.05$ по данным однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

концентрация флавоноидов 1–7, вызывающих такой же процент гибели, была выше – 1000 мкг/мл, что указывало на их большую безопасность по сравнению с веществом сравнения.

Ранее эффективность флавоноидов в качестве ингибиторов панкреатической липазы была показана для некоторых гликозидов апигенина, близких по строению к изученным соединениям [24], однако данный вид активности впервые установлен для ацилированных производных изовитексина. Рассматривая взаимосвязь химического строения и биологической активности флавоноидов *C. sativus*, можно отметить, что наиболее активное соединение 3 содержало два ферулоильных фрагмента и свободную гидроксильную группу у С-4'. У моно-ацилированных гликозидов 1, 2, 6 и 7 активность была несколько ниже, а при замещении гидроксила у С-4' остатком глюкозы соединения 4 и 5 теряли способность к ингибированию активности липазы. Таким образом, наличие фрагментов феруловой или *n*-кумаровой кислот в структуре флавоноидов, а также свободного гидроксила у С-4' в кольце В оказывало влияние на проявление ингибиторного действия на панкреатическую липазу, что ранее было показано для других флавоноидов, обнаруженных в *Camellia sinensis*, *Erechtocloa ophiuroides* и *Litchi chinensis* [25]. Известные ингибиторы липазы из группы природных апигенинов – изовитексин и сапонарин (изовитексин-7-*O*-глюкозид), демонстрировали меньшую эффективность (IC₅₀ > 100 мкг/мл) [24], по сравнению с наиболее активным флавоноидом 3, что позволило рассматривать данное соединение в качестве перспективного биоактивного агента.

Проведенные исследования показали, что зеленые отходы, образующиеся при культивирова-

нии *C. sativus*, представляют собой растительный источник для получения ацилированных флавоноидов, которые обладают способностью к ингибированию активности панкреатической липазы человека. Эти соединения могут быть использованы для создания новых лекарственных средств для лечения и профилактики нарушений метаболических расстройств обмена липидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-26-00063, (<https://rscf.ru/project/23-26-00063>).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Volkova I.N. // Geograph. Environ. Living Syst. 2021. V. 1. P. 93–109. <https://doi.org/10.18384/2712-7621-2021-1-93-109>
2. Sharipov Sh.I., Ibragimova B.Sh. // Econ. Anal. Theory Pract. 2018. V. 17. P. 1340–1355. <https://doi.org/10.24891/ea.17.12.1340>
3. Седых Т.В., Погребняк С.В. // Вестник ОмГАУ. 2016. № 3. С. 53–58.
4. Korotseva I.B., Belov S.N. // Veget. Crops Russ. 2022. V. 6. P. 29–34. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2022-6-29-34>
5. Khan A., Mishra A., Hasan S.M., Usmani A., Ubaid M., Khan N., Saidurrahman M. // J. Complement. Integr. Med. 2022. V. 19. P. 843–854. <https://doi.org/10.1515/jcim-2020-0240>
6. Mukherjee P.K., Nema N.K., Maity N., Sarkar B.K. // Fitoterapia. 2013. V. 84. P. 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.10.003>

7. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Chem. Nat. Compd. 2023. V. 58. P. 324–329. <https://doi.org/10.1007/s10600-022-03858-9>
8. Lowe M.E. // Ann. Rev. Nutr. 1997. V. 17. P. 141–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.141>
9. Zhu G., Fang Q., Zhu F., Huang D., Yang C. // Front. Genet. 2021. V. 12. 693538. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.693538>
10. Liu T.-T., Liu X.-T., Chen Q.-X., Shi Y. // Biomed. Pharmacother. 2020. V. 128. 110314. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110314>
11. Li M., Chen Y., Ruan J., Wang W., Chen J., Zhang Q. // Curr. Res. Food. Sci. 2023. V. 6. 100424. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100424>
12. Olennikov D.N., Khandy M.T., Chirikova N.K. // Horticulturae. 2022. V. 8. 975. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100975>
13. Olennikov D.N., Chemposov V.V., Chirikova N.K. // Foods. 2022. V. 11. 2801. <https://doi.org/10.3390/foods11182801>
14. McNally D.J., Wurms K.V., Labbé C., Quideau S., Bélanger R.R. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 1280–1283. <https://doi.org/10.1021/np030150y>
15. Abou-Zaid M.M., Lombardo D.A., Kite G.C., Grayer R.J., Veitch N.C. // Phytochemistry. 2001. V. 58. P. 167–172. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00156-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00156-x)
16. Kashchenko N.I., Jafarova G.S., Isaev J.I., Olennikov D.N., Chirikova N.K. // Plants. 2022. V. 11. 2126. <https://doi.org/10.3390/plants11162126>
17. Olennikov D.N., Chirikova N.K. // Chem. Nat. Compd. 2019. V. 55. P. 1032–1038. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02887-1>
18. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. V. 59. P. 59–67. <https://doi.org/10.1134/S0003683823010064>
19. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. // Chem. Nat. Compd. 2020. V. 56. P. 1026–1034. <https://doi.org/10.1007/s10600-020-03220-x>
20. An L., Wang J., Liu Y., Chen T., Xu S., Feng H., Wang X. // Proc. SPIE. 2003. V. 4896. P. 223–231. <https://doi.org/10.1117/12.468231>
21. Insanu M., Zahra A.A., Sabila N., Silviani V., Haniffadli A., Rizaldy D., Fidrianny I. // Maced. J. Med. Sci. 2022. V. 10. P. 616–622. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2022.8337>
22. Zhao L., Huang Y., Paglia K., Vaniya A., Wancewicz B., Keller A.A. // Environ. Sci. Technol. 2018. V. 52. P. 7092–7100. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00742>
23. Custers E.M.E., Kiliaan J.A. // Progr. Lipid Res. 2022. V. 85. 101144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101144>
24. Rahim A.T.M.A., Takahashi Y., Yamaki K. // Food Res. Int. 2015. V. 75. P. 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.017>
25. Buchholz T., Melzig M. // Planta Med. 2015. V. 81. P. 771–783. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546173>

Acylated Flavonoids from *Cucumis sativus* Inhibit Activity of Human Pancreatic Lipase

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

^a*Institute of General and Experimental Biology SD RAS, Ulan-Ude, 670047 Russia*

^{*}*e-mail: olennikovdn@mail.ru*

Lipid metabolism disorders are a large group of diseases for the treatment of which various strategies are used including the use of pancreatic lipase inhibitors reduced the intake and adsorption of lipids. This study was the first shown that agricultural wastes of cucumber (*Cucumis sativus*) can be a source of the effective lipase inhibitors. As a result of the chromatographic separation of *C. sativus* leaves metabolites, seven acylated flavonoids were identified, including three new derivatives of isovitexin characterized by UV, NMR spectroscopy and mass spectrometry data as isovitexin-2"-*O*-glucoside-6'''-*O*-ferulate (**1**), isovitexin-2"-*O*-glucoside-6'''-*O*-*p*-coumarate (**2**), and isovitexin-2"-*O*-(6'''-*O*-feruloyl)-glucoside-6'''-*O*-ferulate (**3**). The quantitative HPLC data showed that the total content of the acylated flavonoids in the leaves of Russian varieties *C. sativus* amounted to 3.78–7.44 mg/g of dry plant weight. Isolated compounds demonstrated the ability to inhibit the human pancreatic lipase and the effectiveness of compound **3** was the greatest and exceeded the activity of the reference compound Orlistat. This study has shown that *C. sativus* leaves can be the useful source of biologically active phytochemicals with hypolipidemic activity.

Keywords: *Cucumis sativus*, human pancreatic lipase, inhibitors, acylated flavonoids, isovitexin

УДК 57.083:57.084

ПОЛУЧЕНИЕ ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ НА БЕЛКИ ТЕПЛООВОГО ШОКА, ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ У МЫШЕЙ С КСЕНОТРАНСПЛАНТИРОВАННЫМИ ОПУХОЛЯМИ

© 2023 г. Л. А. Дыкман¹, С. А. Староверов^{1, 2}, Р. Д. Вырщиков¹,
К. К. Фурсова³, Ф. А. Бровко³, Д. А. Солдатов², О. И. Гулий¹. *

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

³Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московская область, 142290 Россия

*e-mail: gulyi_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 28.02.2023 г.

Принята к публикации 01.03.2023 г.

С использованием “наивной” фаговой библиотеки scFv человека проведена аффинная селекция мини-антител, специфичных к белкам теплового шока, выделенным из клеток гепатомы линии МН22а и плазмоцитомы линии Sp2/0-Ag14 мыши. С помощью полученных фаговых антител методами дот-иммуноанализа и твердофазного иммуоферментного анализа изучена динамика концентрации белков теплового шока в сыворотке крови мышей с имплантированными опухолевыми клетками линии МН22а. Начиная с 14 сут после ксенотрансплантации, наблюдался постепенный рост уровня белков теплового шока в сыворотке крови. Установлено, что после имплантации опухолевых клеток рост опухоли сопровождался достоверным повышением накопления белков теплового шока в сыворотке крови. Показано, что миниантитела, специфичные к белкам теплового шока, являются эффективным инструментом для определения и мониторинга накопления белков теплового шока в сыворотке крови животных.

Ключевые слова: белки теплового шока, фаговая библиотека антител, культуры опухолевых клеток, ксенотрансплантированные опухоли, иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0555109923040050, EDN: QYSAXC

Белки теплового шока (БТШ) известны, прежде всего, как высококонсервативные шаперонные белки, участвующие в сворачивании, сборке и разборке белковых комплексов [1]. Эти белки являются внутриклеточными и органеллоспецифичными молекулами, но также встречаются в цитозоле, плазматической мембране, внеклеточных везикулах, биологических жидкостях и кровотоке. Изначально они характеризовались как белки, индуцирующиеся в клетках при стрессовом воздействии, особенно при тепловом шоке [2]. БТШ играют важную роль в опухолевых процессах, поскольку участвуют в различных связанных с раком действиях, таких как пролиферация клеток, метастазирование и устойчивость к противоопухолевым препаратам [3]. Внутриклеточные БТШ, особенно Hsp27, Hsp72 и Hsp90, накапливаются

до высоких концентраций при многих типах рака. Предполагается, что БТШ пролиферируют в раковых клетках в ответ на фолдинговые стрессы, возникающие при злокачественной трансформации и опухолевой прогрессии [4, 5]. Функции БТШ связаны с возникновением, прогрессированием и метастазированием рака, а также с резистентностью к терапии рака. Кроме того, изучается потенциальное использование БТШ для усиления эффектов химио-, радио- и иммунотерапии [6, 7]. БТШ имеют множество клинических применений в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования рака, а также в качестве потенциальных терапевтических мишеней для противоракового лечения [8].

Шаперонная активность БТШ, по сути, опосредует эффективный захват, процессинг и кросс-пре-

зентацию опухолевых пептидных антигенов (Аг) дендритными клетками [9, 10]. Поэтому БТШ играют важную роль в формировании противоопухолевого адаптивного иммунного ответа [11]. Установлено, что белок Hsp70, попадая в межклеточное пространство, вызывает иммунный ответ, снижающий скорость роста опухолей [12]. БТШ стимулируют продукцию хемокинов, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [13]. Термостабильные белки из семейства БТШ активно используют в качестве адъювантов при разработке противоопухолевых вакцин для целого ряда онкологических заболеваний [14–17]. Некоторые из этих разработок дошли до третьей фазы клинических исследований [18–21]. Показана принципиальная возможность использования БТШ, конъюгированных с наночастицами золота (НЧЗ), для противоопухолевой вакцинации [22].

В литературных источниках появляется все больше доказательств того, что БТШ сверхэкспрессированы во многих типах злокачественных опухолей, что само по себе способствует инвазии и метастазированию [12, 23, 24]. Например, показано, что уровни БТШ повышены при ряде видов рака, а их сверхэкспрессия связана с плохим прогнозом и ответом на терапию [5, 25, 26]. Таким образом, БТШ являются своеобразными маркерами для ранней диагностики опухолей и прогноза при мониторинге лечения у пациентов с распространенными видами рака – онкомаркерами [27–29]. БТШ также могут служить вспомогательными маркерами при необходимости дополнительного подтверждения диагноза на фоне других симптомов и при оценке эффективности противоопухолевой терапии. Оценка уровня БТШ в сыворотке крови онкологических больных становится значимой областью исследований, направленных на разработку средств для практического применения в клинической онкологии. Для диагностики онкомаркеров в биологических жидкостях используют, в частности, различного рода иммунохимические методики, в том числе биосенсоры [30–32].

Одно из существенных направлений при диагностике рака связано с неинвазивными исследованиями на основе онкомаркеров. Важнейшей составляющей при разработке диагностических систем для индикации онкомаркеров является подбор соответствующего биорецептора. В качестве биоселективного агента (элемента распознавания) преимущественно используют антитела (Ат), специфичные к определяемому Аг. Существует несколько технологий получения Ат, в основном, связанных с иммунизацией животных. В последнее время в молекулярной биологии стали использовать генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов G (IgG), которые являются относительно дешевыми и мо-

гут конкурировать по селективности с гибридными технологиями. К такому методу относится технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки.

Технология фагового дисплея была разработана в середине 80 гг. Она основана на экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13 путем вставки гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с белком минорной оболочки рIII нитчатого бактериофага [33]. В 1990 гг. метод фагового дисплея был использован для экспонирования антигенсвязывающих фрагментов IgG на поверхности бактериофага fd [34]. Метод не требует использования животных, длительных процедур иммунизации, дорогих сред и культур животных клеток. Рекомбинантные фаговые Ат (миниантитела) успешно зарекомендовали себя в качестве биорецепторов в различных биосенсорных системах [35–37], в том числе для детекции БТШ микобактерий, вызывающих туберкулез [38], и клеток карциномы легкого человека A549 *in vitro* [39]. Хотя в настоящее время полная замена моноклональных и поликлональных IgG фрагментами Ат неживотного происхождения маловероятна, фаговые Ат следует рассматривать как ценный дополнительный или даже альтернативный вариант, особенно в тех случаях, когда их адаптируемость является истинным преимуществом. Преимущество фаговых антител заключается в отсутствии необходимости иммунизации животных, что значительно сокращает время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с нескольких месяцев до нескольких недель. Кроме того, стратегия селекции фаговых антител может быть адаптирована к индивидуальным потребностям исследования не только при онкодиагностике, но и оценке эффективности противораковой терапии [35–39].

Цель исследования – получение фаговых Ат к БТШ, выделенным из клеток опухолевых линий гепатомы и плазмоцитомы, и их использование для иммунодиагностики и анализа динамики накопления БТШ в плазме крови мышей при трансплантации опухоли и в сыворотке крови спонтанно заболевших животных.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток. В экспериментах использовали клетки гепатомы линии МН22а и плазмоцитомы линии Sp2/0-Ag14 мыши. Клеточные линии были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Россия). Нарастивание клеток проводили на среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM; Биолот, РФ) с

добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (“БиоЛот”, РФ), 100 ед./мл пенициллина (“Gibco”, Ирландия), 100 мкг/мл стрептомицина (“Gibco”, Ирландия) и 292 мкг/мл L-глутамина (“Gibco”, Ирландия). Культуры клеток росли в стерильных флаконах для адгезионных клеточных культур до достижения монослоя.

Получение тотальной фракции термостабильных антигенов из клеток линии МН22а. После достижения монослоя проводили выделение клеточных БТШ по методу, описанному в работах [40, 41]. Культуральный флакон с клеточным монослоем прогревали при 42°C в течение 1 ч и затем инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Далее проводили лизирование клеток. Флакон аккуратно промывали 4 раза 10 мл подогретого раствора Хэнкса (“ПанЭко”, РФ). Затем добавляли 15 мл культуральной среды DMEM с 4 мМ L-глутамин и 2 мМ фенилметилсульфонил фторида (“Sigma-Aldrich”, США). Флакон инкубировали 1 ч при 37°C при покачивании на шейкере. После отмывки во флакон с клеточным монослоем добавляли 10 мл буфера Cytomix (“Bio-Rad”, США) и замораживали флакон при –20°C, затем оттаивали при 37°C. Эту процедуру повторяли 3 раза. Супернатант переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 10000 g 15 мин. Как вариант данного способа использовали снятие клеток с монослоя трипсинизацией, а затем проводили лизис 7×10^6 опухолевых клеток по описанной процедуре. Полученные препараты осветляли центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин, определяли концентрацию белка в лизате по методу Брэдфорд и замораживали при –70°C. Как показано ранее [22] лизат нагретых клеток содержал все основные семейства БТШ.

Далее лизат клеток осаждали сульфатом аммония при 40% насыщения с последующим центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин и 4°C. Полученный супернатант осаждали сульфатом аммония при конечном насыщении 80%, затем также центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин и 4°C. Осадок, полученный после второго центрифугирования, растворяли в 4 мл дистиллированной воды и диализовали против 0.2 М фосфатно-солевой буфера (ФСБ), pH 7.2, при 4°C в течение 48 ч с частой сменой буфера. Полученные после этого экстракты использовали для дальнейшей хроматографической очистки.

Хроматографическая очистка антигенов. Очистку Ag проводили методом ионообменной хроматографии на колонке Toyopearl DEAE-650 (“Sigma-Aldrich”, США), образцы анализировали на хроматографе NGC Quest 10 (“Bio-Rad”, США). Носитель уравнивали 0.05 М Трис-НСl, pH 7.5. Диализованный образец (100 мкл), содержащий 240 мкг белка, наносили на колонку. Элюцию белков проводили, используя ступенчатый градиент

от 0 до 0.5 М NaCl и собирали фракции содержащие БТШ. Значения оптической плотности элюатов контролировали при 280 нм с помощью спектрофотометрического детектора Spectronic-21 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Аффинная селекция Ag из фаговой библиотеки.

Ag, специфичные к БТШ, получали с использованием неиммунной фаговой библиотеки одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv) человека (разнообразие 10^9 независимых клонов) [42]. В работе использовали процедуру селекции Ag, адаптированную под данную комбинаторную фаговую библиотеку и описанную в статье [43]. БТШ, выделенные из опухолевых клеток, иммобилизовали на мембране из поливинилиденфторида (PVDF), обработанной метанолом, в течение ночи при 4°C. Затем мембрану блокировали 2%-ным сухим молоком в ФСБ в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре, трижды промывали в ФСБ и использовали для селекции Ag. Мембрану с иммобилизованным Ag инкубировали с 10^{11} фаговых частиц в объеме 200 мкл библиотеки на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч. Неспецифически сорбировавшиеся фаговые частицы отмывали 15 раз в ФСБ. Оставшиеся фаги элюировали 0.1 М глицин-НСl буфером pH 2.5 (500 мкл) на шейкере при комнатной температуре. Элюат фагов собирали и нейтрализовали 500 мкл 1 М Трис-НСl, pH 9.5.

Компетентную культуру *Escherichia coli* TG1 получали, выращивая клетки до логарифмической фазы роста при 37°C без встряхивания для образования F-пилей. Нейтрализованный элюат (1 мл) использовали для заражения *E. coli* TG1. После 30 мин инкубации культуры при 37°C без встряхивания инфицированные клетки осаждали центрифугированием при 2000 g 10 мин и пересевали на среду 2xYT (“BD Difco”, США) со 100 мкг/мл ампициллина (“Gibco”, Ирландия) и 1% глюкозы. Посев инкубировали на шейкере при 37°C в течение ночи. 1 мл культуры пересевали на 10 мл свежей 2xYT со 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы и инкубировали на шейкере при 37°C до достижения оптической плотности 0.4–0.6 при 600 нм (~3 ч). Затем клетки инкубировали 30 мин при 37°C без встряхивания и добавляли 10^{11} частиц желперного фага M13KO7. После 30 мин инкубации при 37°C без встряхивания инфицированные клетки осаждали центрифугированием при 2000 g 10 мин и пересевали на среду 2xYT со 100 мкг/мл ампициллина, 50 мкг/мл канамицина (“Gibco”, Ирландия) и 100 мкг/мл изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозиды (“Thermo Fisher Scientific”, США). Посев инкубировали на шейкере при 30°C в течение ночи. После чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 g 20 мин, супернатант дополнительно осветляли от дэбриса центрифугированием при 10000 g 20 мин.

К супернатанту добавляли 1/5 объема раствора ПЭГ/NaCl, инкубировали при 0°C до образования видимого преципитата, который затем осаждали центрифугированием при 4000 g 1 ч. Осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч до полного растворения и осветляли центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин. Супернатант, содержащий фаговые частицы, диализовали против ФСБ через диализную мембрану с пределом исключения 14–16 кДа при 4°C в течение суток 4-кратно меняя буфер. К диализату добавляли глицерин до конечной концентрации 50% и хранили при температуре –20°C до использования в следующем раунде селекции. По описанной выше схеме было проведено три последовательных раунда селекции.

Синтез наночастиц золота и получение конъюгатов с биоспецифическими зондами. Золотые наносферы диаметром 15 нм получали по методу Френса [44], используя реакцию восстановления HAuCl_4 цитратом натрия. Восстановление проводили при нагревании 242.5 мл 0.01%-ного водного раствора HAuCl_4 (“Sigma-Aldrich”, США) в колбе Эрленмейера на магнитной мешалке с обратным водяным холодильником. После закипания добавляли 7.5 мл 1%-ного водного раствора цитрата натрия (“Fluka”, Швейцария). Диаметр синтезированных НЧЗ был определен методами спектрофотометрии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и динамического рассеяния света (ДРС).

Перед конъюгацией 15-нм НЧЗ со стафилококковым белком А (“Sigma-Aldrich”, США) или с козьими Ат к IgG кролика (“Sigma-Aldrich”, США) определяли “золотое число” – минимальное количество белка, защищающее определенный объем золя от солевой агрегации [45]. Для этого в 96-луночном микротитровальном планшете двукратно по 20 мкл титровали водный раствор белка с начальной концентрацией 1 мг/мл. В каждую лунку добавляли по 200 мкл 15-нм НЧЗ ($A_{520} = 1.0$) и по 20 мкл 1.7 М NaCl и определяли минимальную стабилизирующую концентрацию. При получении конъюгата НЧЗ со стафилококковым белком А “золотое число” составило 6 мг/мл, с козьими Ат к IgG кролика – 12 мг/мл. Конъюгацию проводили простым смешением реагентов без использования сшивающих агентов, используя концентрацию белка на 20% превышающую “золотое число”.

Дот-блот иммуноанализ. Дот-иммуноанализ проводили по следующей методике [45]: в качестве образцов на PVDF мембрану, обработанную метанолом, или нитроцеллюлозную мембрану в виде серии точек наносили по 1 мкл двойных разведений хроматографически очищенного Ag либо полученной от животных сыворотки и инкубировали в течение ночи при 4°C для фиксации Ag. За-

тем проводили блокирование мембраны с нанесенным на нее Ag в течение 1 ч 2%-ным сухим молоком, разведенным в 10 мМ ФСБ, pH 7.2. Затем мембрану инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 1 ч в растворе фаговых Ат с концентрацией 10^{12} фагов/мл. После трехкратной промывки в ФСБ мембрану инкубировали на шейкере в 2 мл ФСБ с 50 мкл раствора кроличьих антифаговых Ат. При наличии биоспецифического взаимодействия Ат связывались с Ag, адсорбированным на мембране. Далее мембрану трижды отмывали в ФСБ от неспецифически связанных Ат и погружали в раствор конъюгата НЧЗ ($A_{520} = 1$) со стафилококковым белком А в случае БТШ, либо с козьими Ат к IgG кролика в случае сывороток. Связывание конъюгата с комплексом Ag-Ат можно было визуальным образом наблюдать в виде серии красных пятен. Аналогично проводили дот-иммуноанализ с использованием в качестве маркера моноклональных Ат к IgG кролика, меченных пероксидазой хрена (“Jackson ImmunoResearch”, Великобритания).

После электрофореза хроматографически очищенного Ag в ПААГ с ДДС по Лэммли образцы переносили полусухим способом на PVDF мембрану и инкубировали в течение 1 ч в блокирующем ФСБ, содержащем 0.1%-ный Твин 20 и 5% обезжиренного сухого молока. Затем мембрану инкубировали в течение 1 ч в полученных фаговых Ат с концентрацией 10^{12} фагов/мл. После трехкратной отмывки мембрану погружали в раствор кроличьих антифаговых Ат. Затем мембрану трижды отмывали в ФСБ от неспецифически связанных Ат и погружали в раствор конъюгата НЧЗ ($A_{520} = 1$) со стафилококковым белком А.

Иммуноферментный анализ. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) проводили по общепринятой схеме [46]. В лунку планшета адсорбировали полученную от животных сыворотку (в качестве отрицательного контроля использовали сыворотку от здорового животного), разведенную 1 : 20 0.05 М карбонат-бикарбонатным буфером, pH 9.6, в серии двойных разведений и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем лунки промывали трехкратно ФСБ и блокировали свободные сайты связывания 200 мкл 2% сухого молока в 0.05 М карбонат-бикарбонатным буфере 1 ч на шейкере при 37°C. После чего в каждую лунку вносили разведенные в 100 раз миниантигены к БТШ и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при 37°C. Затем после трехкратной отмывки добавляли в лунки по 100 мкл кроличьих антифаговых Ат, разведенных 1 : 500 в 10 мМ ФСБ (pH 7.4) и инкубировали в течение 1 ч на термощейкере при 37°C. После этого проводили трехкратную отмывку и добавляли в лунки по 100 мкл козьих Ат к IgG кролика, меченных пероксидазой хрена (“Sigma-Aldrich”, США), разведенных 1 : 500 в 10 мМ ФСБ

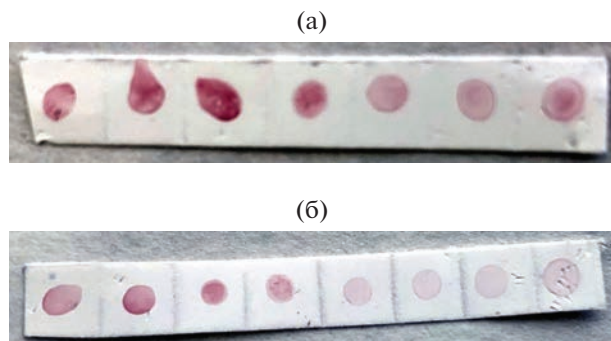


Рис. 1. Дот-иммуноанализ Ag, выделенных из клеток линии MN22a (а) и линии Sp2/0-Ag14 (б) с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат – кроличьи антифаговые IgG. Мечение – конъюгат НЧЗ со стафилококковым белком А. (Двойные разведения, начальная концентрация 1 мг/мл).

(рН 7.4) и инкубировали в течение 1 ч на термошейкере при 37°C. Затем трижды отмывали карбонат-бикарбонатным буфером. В качестве субстрата пероксидазы использовали 100 мкл 0.006%-ного ортофенилендиамина (“Flucka”, Швейцария) в 0.1 М цитратном буфере, рН 6.0, содержащем 0.01% пероксида водорода. Инкубацию с субстратом проводили в темноте. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0.1 М серной кислоты. Результаты реакции регистрировали на микропланшетном спектрофотометре Multiskan Accent+ (“Thermo Fisher Scientific”, США) при длине волны 490 нм.

Имплантация животным опухолевых клеток. В исследовании были использованы белые мыши линии BALB/c (18–20 г). Мыши были приобретены в Отделе экспериментальных животных с виварием Российского научно-исследовательского противочумного института “Микроб” (Россия). Животным подкожно трансплантировали опухолевые клетки MN22a. Их вводили в холку в дозе 1×10^9 кл./мышь ($n = 4$). Первые признаки опухолей появились через 14 дней после заражения; на 37 сут опухоли были наиболее отчетливо выражены. В процессе наблюдения проводили забор крови на наличие БТШ в сыворотке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика синтезированных НЧЗ. Диаметр синтезированных НЧЗ был определен методами спектрофотометрии, ТЭМ и ДРС. Максимум спектра поглощения полученного золя составил $\lambda_{\max} = 518.7$ нм, при этом оптическая плотность была $A_{520} = 1.15$. По данным ТЭМ и ДРС, средний диаметр полученных наночастиц составил 15.4 нм. Число частиц в 1 мл при $A_{520} = 1$ составляло 1.6×10^{12} .

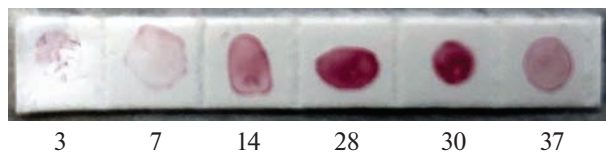


Рис. 2. Динамика накопления БТШ в сыворотки крови мышей после имплантации опухоли (с 3 по 37 сут), определенная методом дот-иммуноанализа с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат – кроличьи антифаговые IgG. Мечение – конъюгат НЧЗ с козьими Ат к IgG кролика.

Проверка активности миниантител к БТШ. Для получения фаговых Ат к БТШ, выделенным из клеток опухолевых линий гепатомы и плазмоцитомы, проводили три раунда селекции. Активность полученных после трех раундов селекции миниантител проверяли методом дот-иммуноанализа, с использованием в качестве аналита хроматографически очищенного термостабильного Ag (начальная концентрация 1 мг/мл), а в качестве маркера – конъюгата НЧЗ со стафилококковым белком А (рис. 1). Минимальное количество Ag, обнаруживаемое предложенным способом анализа, составило ~15 пг (седьмое разведение). Оценку специфичности полученных фаговых Ат осуществляли с использованием Вестерн-блота. Фаговые Ат специфически распознавали пептиды в области 45–66 кДа.

Анализ накопления БТШ в сыворотке крови мышей с ксенотрансплантированными опухолями. С использованием полученных фаговых Ат методом дот-иммуноанализа была качественно изучена динамика концентрации БТШ в сыворотке крови мышей с имплантированными опухолевыми клетками линии MN22a (рис. 2). С 14 дня после трансплантации визуально наблюдалось усиление окрашивания комплексов Ag-Ат, выявляемое с применением конъюгата НЧЗ с козьими Ат к IgG кролика, что свидетельствовало о нарастающей концентрации БТШ в сыворотке крови.

С помощью полученных фаговых Ат методом твердофазного ИФА была количественно изучена динамика концентрации БТШ в сыворотке крови мышей с имплантированными опухолевыми клетками линии MN22a. После имплантирования опухолевых клеток мышам наблюдали рост опухоли, начиная с 14 дня после трансплантации. В этот период отмечалось повышение уровня БТШ в сыворотке крови мышей, их концентрация составила 0.15 ± 0.05 мкг/мл. В дальнейшем наблюдался постепенный рост концентрации БТШ в сыворотке крови и на 37 сут (когда опухоль была наиболее выражена) уровень БТШ в сыворотке составил 0.35 ± 0.1 мкг/мл (рис. 3). Приведенные в работе результаты, полученные с помощью фа-

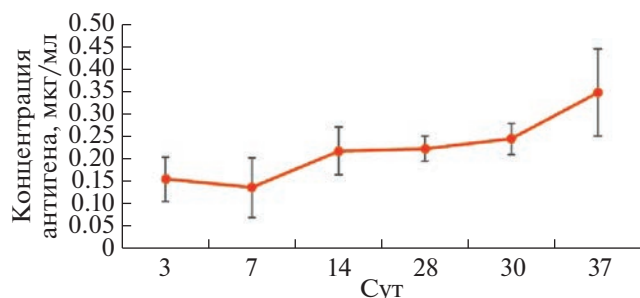


Рис. 3. Динамика изменения концентрации БТШ в сыворотке крови мышей после имплантации опухоли, определенная методом твердофазного ИФА с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат — кроличьи антифаговые IgG. Выявление — козы Ат к IgG кролика, меченные пероксидазой хрена.

говых Ат, соответствуют показателям уровня БТШ (в норме и при опухолевом процессе), определенному методом твердофазного ИФА с использованием моноклональных Ат [47].

Поскольку изменение уровня БТШ в сыворотке животных является маркером не только для диагностики, но и для прогноза лечения опухоли, был проведен анализ изменения уровня БТШ в сыворотке крови спонтанно заболевших животных. Известно, что иммунохимическая детекция БТШ с использованием антител зависит не от видов лабораторных животных, а от наличия БТШ в опухолях и сыворотках крови [48, 49]. В экспериментах использовали трех стерилизованных кошек возрастом 9 (К1; фибросаркома), 12 (К2; аденома молочной железы) и 13 (К3; аденокарцинома молочной железы) лет с подтвержденными онкологическими диагнозами. Кроме клинических признаков диагноза были подтверждены цитологическими и гистопатологическими исследованиями. С использованием дот-иммуноанализа установлено, что полученные фаговые Ат способны выявлять как выделенный и очищенный Аг (начальная концентрация 1 мг/мл), так и Аг, присутствующий в сыворотке крови спонтанно заболевших животных (рис. 4). Полученные миниантитела выявляли как выделенный из опухолевых клеток Аг (минимально выявляемое количество ~15 нг), так и детектировали Аг в сыворотках крови спонтанно заболевших животных.

Таким образом, показано, что фаговые Ат имеют большой потенциал для эффективного мониторинга накопления БТШ в сыворотке крови животных с имплантированными опухолями как качественно — с использованием дот-иммуноанализа, так и количественно — с применением твердофазного ИФА.

Следует отметить, что фаговые Ат имели ряд преимуществ перед другими типами Ат, в том числе:

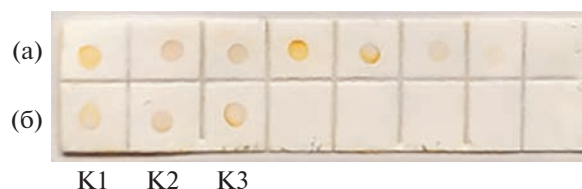


Рис. 4. Дот-иммуноанализ БТШ, выделенного из клеток линии МН22а (а; двойные разведения, начальная концентрация 1 мг/мл), и в сыворотке крови спонтанно заболевших животных (б) с использованием миниантител, полученных из неиммунной фаговой библиотеки scFv человека после третьего раунда селекции. Вторичные Ат — кроличьи антифаговые IgG. Выявление — моноклональные Ат к IgG кролика, меченные пероксидазой хрена. Пояснения к обозначениям приведены в тексте.

— отсутствие необходимости использования лабораторных животных и длительного поддержания культур клеток эукариот;

— время получения индивидуальных клонов-продуцентов миниантител составляло 10–14 дней, по сравнению с несколькими месяцами в случае гибридомной технологии или процедуры иммунизации животных;

— относительная простота получения Ат и их низкая себестоимость.

В дальнейшем фаговые Ат к опухолевым Аг могут быть использованы для мониторинга иммунного ответа как у животных с ксенотрансплантированными опухолями, так и у спонтанно заболевших животных. Полученные результаты могут послужить основой для создания диагностических тест-систем, в том числе, биосенсорных, для мониторинга роста опухолей ненаружной локализации, когда болезнь поначалу протекает без внешних проявлений, а также для прогнозирования эффективности процессов лечения и вакцинации. Полученные в работе фаговые Ат, специфичные к БТШ, являются перспективными для применения в качестве распознающего элемента биосенсоров при диагностике опухолей. Большинство сенсорных систем для индикации онкологических заболеваний ориентированы на применение в качестве сенсорного элемента Ат [31] и фаговых Ат [50], аптамеров [51], амплификации микроРНК на основе дуплекс-специфической нуклеазы [52], а также мониторинга активных форм кислорода [53, 54]. Представленное исследование отличается от уже описанных методов тем, что ориентировано на использование фаговых Ат в качестве эффективного инструмента для мониторинга накопления БТШ. В дальнейшем полученные фаговые Ат могут быть использованы в качестве распознающего элемента сенсорных систем при определении БТШ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда проект № 19-14-00077.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание лабораторных животных и обращение с ними осуществлялись в соответствии с требованиями “Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных” Минздрава РФ, положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” и законодательством Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Schlesinger M.J.* // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 21. P. 12111–12114.
2. *Richter K., Haslbeck M., Buchner J.* // *Mol. Cell.* 2010. V. 40. P. 253–266.
3. *Albakova Z., Siam M.K.S., Sacitharan P.K., Ziganshin R.H., Ryazantsev D.Y., Sapozhnikov A.M.* // *Transl. Oncol.* 2021. V. 14. № 2. 100995. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100995>
4. *Arrigo A.P., Gibert B.* // *Cancers.* 2014. V. 6. P. 333–365.
5. *Calderwood S.K., Gong J.* // *Trends Biochem. Sci.* 2016. V. 41. P. 311–323.
6. *Das J.K., Xiong X., Ren X., Yang J.-M., Song J.* // *J. Oncol.* 2019. V. 2019. 3267207. <https://doi.org/10.1155/2019/3267207>
7. *Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q.* // *MedComm.* 2022. V. 3. № 3. e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
8. *Staroverov S.A., Kozlov S.V., Brovko F.A., Fursova K.K., Shardin V.V., Fomin A.S. et al.* // *Biosens. Bioelectron. X.* 2022. V. 11. 100211. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100211>
9. *Murshid A., Gong J., Stevenson M.A., Calderwood S.K.* // *Expert Rev. Vaccines.* 2011. V. 10. № 11. P. 1553–1568.
10. *Троицкая О.С., Новак Д.Д., Рухтер В.А., Коваль О.А.* // *Acta Naturae.* 2022. T. 14. № 1. C. 40–53.
11. *Shevtsov M., Multhoff G.* // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. P. 171. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00171>
12. *Komarova E.Y., Suezov R.V., Nikotina A.D., Aksenov N.D., Garaeva L.A., Shtam T.A. et al.* // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. 21314. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00734-4>
13. *Tsan M.F., Gao B.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. V. 286. № 4. P. C739–C744.
14. *Maki R.G., Livingston P.O., Lewis J.J., Janetzki S., Klimstra D., Desantis D., Srivastava P.K., Brennan M.F.* // *Dig. Dis. Sci.* 2007. V. 52. № 8. P. 1964–1972.
15. *Bolhassani A., Rafati S.* // *Expert Rev. Vaccines.* 2008. V. 7. № 8. P. 1185–1199.
16. *Kang J., Lee H.-J., Lee J., Hong J., Kim Y.H., Disis M.L., Gim J.-A., Park K.H.* // *J. Immunother. Cancer.* 2022. V. 10. e004702. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004702>
17. *Alberti G., Vergilio G., Paladino L., Barone R., Cappello F., de Macario E.C. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 7792. <https://doi.org/10.3390/ijms23147792>
18. *Testori A., Richards J., Whitman E., Mann G.B., Lutzky J., Camacho L. et al.* // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. № 6. P. 955–962.
19. *Lin M.J., Svensson-Arvelund J., Lubitz G.S., Marabelle A., Melero I., Brown B.D., Brody J.D.* // *Nat. Cancer.* 2022. V. 3. P. 911–926.
20. *Friah H., Rovelli R., Chiang C.L.-L., Kandalafi L.E.* // *Cancer Treat. Rev.* 2022. V. 106. 102383. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102383>
21. *Liu J., Fu M., Wang M., Wan D., Wie Y., Wei X.* // *J. Hematol. Oncol.* 2022. V. 15. P. 28. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01247-x>
22. *Dykman L.A., Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Chumakov D.S., Gabalov K.P. et al.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 22. 14313. <https://doi.org/10.3390/ijms232214313>
23. *Jolly C., Morimoto R.I.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 2000. V. 92. № 19. P. 1564–1572.
24. *Yun C.W., Kim H.J., Lim J.H., Lee S.H.* // *Cells.* 2020. V. 9. № 1. P. 60. <https://doi.org/10.3390/cells9010060>
25. *Cornford P.A., Dodson A.R., Parsons K.F., Desmond A.D., Woolfenden A., Fordham M., Neoptolemos J.P., Ke Y.* // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 24. P. 7099–7105.
26. *Saini J., Sharma P.K.* // *Curr. Drug Targets.* 2017. V. 19. № 13. P. 1478–1490.
27. *Ciocca D.R., Calderwood S.K.* // *Cell Stress Chaperon.* 2005. V. 10. № 2. P. 86–103.
28. *Seigneuric R., Mjehed H., Gobbo J., Joly A.-L., Berthenet K., Shirley S., Garrido C.* // *Front. Oncol.* 2011. V. 1. P. 37. <https://doi.org/10.3389/fonc.2011.00037>
29. *Ramirez-Valles E.G., Rodríguez-Pulido A., Barraza-Salas M., Martínez-Velaz I., Meneses-Morales I., Ayala-García V.M., Alba-Fierro C.A.* // *Technol. Cancer Res. Treat.* 2020. V. 19. 1533033820957033. <https://doi.org/10.1177/1533033820957033>
30. *Mahato K., Maurya P.K., Chandra P.* // *3 Biotech.* 2018. V. 8. P. 149. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1148-8>
31. *Cavallaro S., Horak J., Hååg P., Gupta D., Stiller C., Sahu S.S., Görgens A. et al.* // *ACS Sens.* 2019. V. 4. № 5. P. 1399–1408.
32. *Baghbaderani S.S., Mokarian P., Moazzam P.* // *Curr. Anal. Chem.* 2022. V. 18. № 1. P. 63–78.
33. *Smith G.P.* // *Science.* 1985. V. 228. № 4705. P. 1315–1317.
34. *McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J.* // *Nature.* 1990. V. 348. № 6301. P. 552–554.
35. *Zhao F., Shi R., Liu R., Tian Y., Yang Z.* // *Food Chem.* 2021. V. 339. 128084. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128084>
36. *Ye J., Guo J., Li T., Tian J., Yu M., Wang X. et al.* // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2022. V. 21. № 2. P. 1843–1867.
37. *Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A.* // *Biosens. Bioelectron.* 2023. V. 222. 114909. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
38. *Trilling A.K., De Ronde H., Noteboom L., Van Houwelingen A., Roelse M., Srivastava S.K. et al.* // *PLoS One.*

2011. V. 6. № 10. e26754.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026754>
39. Vostakolaei M.A., Molavi O., Hejazi M.S., Kordi S., Rahmati S., Barzegari A., Abdolalizadeh J. // *J. Cell. Biochem.* 2019. V. 120. № 9. P. 14711–14724.
40. Skarga Y., Vrublevskaya V., Evdokimovskaya Y., Morenkov O. // *Biomed. Chromatogr.* 2009. V. 23. № 11. P. 1208–1216.
41. Aguilera R., Saffie C., Tittarelli A., Gonzalez F.E., Ramirez M., Reyes D. et al. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 8. P. 2474–2483.
42. Улитин А.Б., Капралова М.В., Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Булгакова Е.В., Фурсова К.К. и др. // Доклады Академии наук. 2005. Т. 405. № 4. С. 555–558.
43. Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Gabalov K.P., Khanadeev V.A., Soldatov D.A. et al. // *ADMET & DMPK.* 2021. V. 9. № 4. P. 255–266.
44. Frens G. // *Nature Phys. Sci.* 1973. V. 241. P. 20–22.
45. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. № 4. С. 411–418.
46. Shah K., Maghsoudlou P. // *Br. J. Hosp. Med.* 2016. V. 77. № 7. P. C98–C101.
47. Gunther S., Ostheimer C., Stang S., Specht H.M., Mozes P., Jesinghaus M. et al // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 556.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00556>
48. Romanucci M., Bastow T., Della Salda L. // *Cell Stress Chaperon.* 2008. V. 13. № 3. P. 253–262.
49. Ramkaran, Preeti, Kumar R., Kumar S., Gera S. // *Pharma Innov. J.* 2019. V. 8. № 2. P. 431–434.
50. Petrenko V.A., Gillespie J.W., Xu H., O'Dell T., De Plano L.M. // *Viruses.* 2019. V. 11. 785.
<https://doi.org/10.3390/v11090785>
51. Yu Q., Zhao Q., Wang S., Zhao S., Zhang S., Yin Y., Dong Y. // *Anal. Biochem.* 2020. V. 594. 113591.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113591>
52. Djebbi K., Xing J., Weng T., Bahri M., Elaguech M.A., Du C. et al // *Anal. Chim. Acta.* 2022. V. 1208. 339778.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339778>
53. Li Y., Hu K., Yu Y., Rotenberg S.A., Amatore C., Mirkin M.V. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 37. P. 13055–13062.
54. Vaneev A.N., Gorelkin P.V., Garanina A.S., Lopatukhina H.V., Vodopyanov S.S., Alova A.V. et al. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 8010–8014.

Preparation of Phage Antibodies to Heat Shock Proteins and Studying the Dynamics of their Accumulation in Mice with Xenotransplant Tumors

L. A. Dykman^a, S. A. Staroverov^{a, b}, R. D. Vyrshchikov^a, K. K. Fursova^c,
 F. A. Brovko^c, D. A. Soldatov^b, and O. I. Guliy^{a, *}

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

^b*Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia*

^c*The Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia*

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Using a naïve human scFv phage library, affinity selection of miniantibodies specific to heat shock proteins isolated from MH22a hepatoma cells and Sp2/0-Ag14 plasmacytoma cells was carried out. Using the obtained phage antibodies by dot-immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay, the dynamics of the concentration of heat shock proteins in the blood serum of mice with implanted tumor cells of the MH22a line was studied. Starting from the 14th day after xenotransplantation, there was a gradual increase in the level of heat shock proteins in the blood serum. It was found that after implantation of tumor cells, tumor growth was accompanied by a significant increase in the accumulation of heat shock proteins in the blood serum. It has been shown that miniantibodies specific to heat shock proteins are an effective tool for determining and monitoring the accumulation of heat shock proteins in the blood serum of animals.

Keywords: heat shock proteins, antibody phage library, tumor cell cultures, xenotransplanted tumors, immunoassay

УДК 577.112.5

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА БЕЛКОВ МЕТОДАМИ ПРОИЗВОДНОЙ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

© 2023 г. А. Ю. Лянгузов^{1, *}, Н. М. Малыгина^{1, 2}, А. М. Иванов², Т. А. Петрова¹

¹Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

*e-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 10.10.2022 г.

На примере растворов бычьего сывороточного альбумина и кислородпереносящих белков гемоцианина *Achatina fulica* и гемоглобина быка исследованы особенности применения производной УФ-спектрофотометрии в качестве неразрушающего экспресс-метода при выполнении сравнительного анализа препаратов нативных белков. Установлено, что четвертые производные спектров поглощения белков, позволяющие выделить отдельные полосы ароматических аминокислот, оптимальны для решения практических задач. Экспериментально подобран алгоритм расчета четвертых производных. Для подтверждения работоспособности метода выполнена реконструкция четвертых производных спектров нативных белков путем комбинации четвертых производных индивидуальных спектров ароматических аминокислот в зоне 240–300 нм. Для наглядной демонстрации индивидуальных различий белков предложено использовать коэффициент корреляции четвертых производных спектров в диапазоне 240–300 нм или в области поглощения тирозина и триптофана. Несмотря на то, что в результате нельзя дать точную количественную характеристику содержания отдельных ароматических аминокислот в составе белка, можно сравнивать белки друг с другом. Предложенный подход позволяет представить индивидуальный спектральный “портрет” белка, отличающий его от других белков, который затем можно использовать как стандарт при экспериментальной работе с ним.

Ключевые слова: спектры поглощения белков, производная УФ-спектрофотометрия, бычий сывороточный альбумин, гемоглобин, гемоцианин, фенилаланин, тирозин, триптофан, сравнительный анализ белков

DOI: 10.31857/S0555109923040086, **EDN:** QZJQRP

Необходимость выполнения сравнительного анализа белков возникает регулярно при решении разного рода задач: оценка чистоты препаратов белков в ходе их выделения и очистки, выявление различий в близкородственных белках, поиск структурных аналогов белков и их фрагментов, изучение влияния различных факторов на изменение структуры белков и так далее. Сегодня аналитическая биохимия и молекулярная биология располагают широким арсеналом методов для решения этих проблем. Однако оптимальный выбор заключается в том числе и в необходимости использования неразрушающих методов анализа с сохранением нативной структуры белка, и в учете материальных и временных затрат на выполнение исследований.

Цель работы – разработка быстрого неразрушающего способа сравнительного анализа белков методами производной УФ-спектрофотометрии.

МЕТОДИКА

Объектами исследования служили бычий сывороточный альбумин (БСА) (“Sigma-Aldrich”, США), гемоглобин быка с содержанием железа не менее 0.34% (“Reanal”, Венгрия) и гемоцианин из гемолимфы брюхоногого моллюска *Achatina fulica*. Моллюски были любезно предоставлены сотрудниками Ленинградского зоопарка.

Препарат гемоцианина получали методом центрифужной ультрафильтрации плазмы гемолимфы с использованием концентраторов Vivaspin 6 с номинальным порогом отсека 300 кДа (“Sartorius Stedim”, Германия). Дополнительно образец белка дважды промывали деионизированной водой и разводили до объема исходной аликвоты плазмы гемолимфы [1].

Спектральные характеристики растворов белков исследовали в УФ-диапазоне 240–300 нм. Стандартами служили растворы ароматических аминокислот: триптофана (Трп), тирозина (Тир) (“Pan-

reac AppliChem”, США) и фенилаланина (Фен) (“Sigma-Aldrich”, США), все аминокислоты с чистотой выше 99.4%.

Для выполнения экспериментов использовали лабораторную модель спектрофотометра Perkin-Elmer Lambda 35 (США) и программу управления прибором UV WinLab Software 6.0.4 в режиме Scan. Запись исходных спектров производили при установке следующих параметров сканирования: ширина щели 1 нм, скорость сканирования 60 нм/мин, шаг спектра 1 нм. В работе использовали кварцевые кюветы объемом 4 мл с толщиной оптического слоя 1 см.

Концентрации белков подбирались таким образом, чтобы поглощение растворов при 280 нм попадало в диапазон 1.0–1.5 оптических единиц. Концентрации аминокислот подбирали с учетом молярных коэффициентов поглощения. В среднем поглощение аминокислот с учетом максимумов их поглощения находилось в области 0.5 оптических единиц. Все растворы готовили на деионизированной воде.

Сравнительный анализ белков проводили методами производной УФ-спектрофотометрии. Четвертые производные спектров поглощения белков рассчитывали методом численного дифференцирования. Для сравнения четвертых производных использовали коэффициент корреляции.

Для анализа экспериментальных данных и графического представления результатов применяли функции и скрипты библиотеки открытого языка программирования R [2], а также скрипты авторской разработки.

При обработке экспериментальных данных для сглаживания шумов предварительно использовали функцию “spline” языка R, которая увеличивала количество точек в спектре не менее чем в пять раз:

$$ss = \text{spline}(x, y, n = N \times \text{length}(x)),$$

где x – значения длин волн в исходном спектре, y – измеренные значения поглощения, N – кратность увеличения числа точек в спектре.

Далее вычисляли четвертую производную спектра по скользящей центральной пятичленной формуле [3]:

$$y_i^{(4)} = (y_{i-2st} - 4y_{i-st} + 6y_i - 4y_{i+st} + y_{i+2st}) / (h^4),$$

где i – номер точки числового ряда, st – расстояние между узлами дифференцирования, которое выбрали нами таким образом, что $h = st/N = 2$ нм.

Таким образом, основными этапами выполнения анализа явились: запись спектров поглощения в области 240–300 нм, сглаживание паразитных шумов с использованием функции “spline”, расчет четвертых производных спектров методом численного дифференцирования, расчет коэффициентов корреляции четвертых производных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методы, основанные на спектрофотометрии, позволяют быстро, недорого и, главное, неразрушающим способом изучать растворы нативных белков, а также при необходимости оценивать влияние различных факторов на изменение их структуры.

В настоящей работе выбор белков для сравнительного анализа продиктован следующими соображениями. БСА является “золотым стандартом” в биохимических исследованиях. Гемоцианин ахатины – функциональный аналог гемоглобина, транспортирующего кислород. БСА – простой белок, гемоглобин и гемоцианин – сложные. У гемоглобина протетической группой служит гем – комплекс протопорфирина IX с железом, а у гемоцианина – ионы меди, координированные на имидазолах остатков Гис. Молекула гемоглобина содержит четыре гема, тогда как молекула гемоцианина – несколько сотен ионов меди, попарно формирующих многочисленные центры связывания кислорода [4, 5]. Молекулярная масса БСА составляет 66 кДа [6], гемоглобина – 64.5 кДа [7], а гемоцианина брюхоногих – около 9000 кДа, и это один из самых высокомолекулярных белков, известных в природе [8]. В молекуле БСА одна полипептидная цепь, гемоглобина – четыре, а в молекуле гемоцианина их десятки, сгруппированные по восемь в составе субъединиц, объединенных в дидекамеры [9]. Все три белка количественно доминируют *in situ*: доля БСА составляет порядка 60% общего белка плазмы крови [6], гемоглобина – 90% общего белка эритроцитов [10], а у брюхоногих моллюсков гемоцианином представлено не менее 90% белка плазмы гемолимфы [11].

Спектры поглощения трех белков были проанализированы нами в УФ-диапазоне длин волн. В качестве примера на рис. 1 приведены спектр поглощения БСА и его четвертая производная.

Поглощение света в УФ-зоне обусловлено наличием в составе белков ароматических аминокислот Фен, Тир и Трп с индивидуальными максимумами поглощения при длинах волн 257, 274 и 280 нм, соответственно [12]. На исходных спектрах белков полосы Тир и Трп частично перекрываются, а Фен почти незаметен из-за низкого значения молярного коэффициента его поглощения. В результате наблюдается лишь суммарный широкий размытый пик, поэтому спектры практически любых растворимых белков в области 240–300 нм очень похожи друг на друга, несмотря на различия в аминокислотном составе.

Обычно при проведении спектрального анализа для удаления паразитных шумов используют метод накопления спектров – последовательную многократную запись спектров одного образца в одинаковых условиях. Мы пошли другим путем, используя для обработки спектральных данных

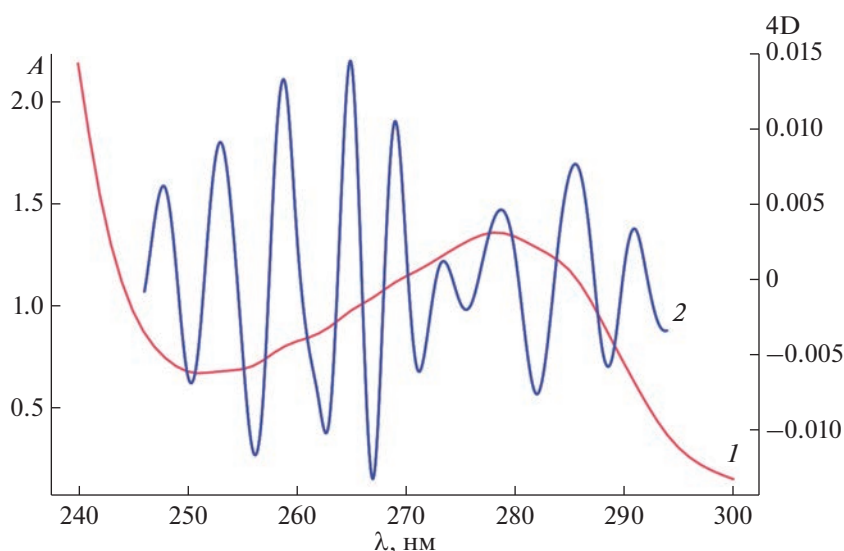


Рис. 1. Спектр поглощения БСА в УФ-диапазоне (1) и его четвертая производная (2).

математическую опцию “spline”, применяемую для сглаживания экспериментальных кривых, которые невозможно описать какой-либо одной определенной математической функцией. Необходимо заметить, что “spline” используется исключительно для сглаживания кривых, никак не повышая разрешающую способность самого экспериментального метода: действительно, эта опция работает так, что сначала увеличивается число точек, описывающих кривую, причем кратность увеличения числа точек подбирается экспериментально. Нами были просмотрены разные варианты, оптимальным оказался вариант с кратностью увеличения числа точек $N \geq 5$. Коэффициент N также включен в формулу численного дифференцирования, которая затем была использована нами при расчете четвертых производных спектров.

Операции “spline” вместо многократной циклической записи накопления спектров оказалось достаточно для решения наших задач. Кроме того, поскольку мы имеем дело с нативными белками, то фактор времени выполнения анализа весьма существен, особенно при работе с термолabile белками.

Методы производной УФ-спектрофотометрии позволяют выделить отдельные полосы хромофоров в исходных спектрах [13]. Выбор четвертой производной оптимален для решения практических задач: в спектре выделяются полосы слагающих его компонентов, максимумы четвертых производных соответствуют максимумам полос самих спектров, причем содержание хромофоров отражается на интенсивности полос четвертых производных, и такие картины более информативны с точки зрения выявления индивидуальных характеристик исследуемых соединений. Несмотря на широкое

использование спектрофотометрии в белковой химии, в доступной нам литературе мы нашли лишь несколько работ, где для исследования белков применялась именно производная спектрофотометрия, причем авторы ограничивались расчетами только вторых производных, сообщая, что использование четвертых производных было бы более эффективным [14, 15].

Конечные результаты численного дифференцирования зависят от величины параметров, включенных в формулы расчетов, и на это требуется обратить особое внимание.

Для вычисления четвертых производных применяли симметричную скользящую пятичленную формулу с экспериментально подобранным нами шагом $st = 2N$, где коэффициент N равен кратности увеличения числа точек спектра. Такой комбинированный подход использования опции “spline” с последующим вычислением четвертой производной позволил оценить положение отдельных ароматических аминокислот в суммарном спектре белка (рис. 1, 2). Следует заметить, что специфика использования скользящей формулы приводила к тому, что значения производной определялись за исключением $2st$ первых и последних членов числового ряда, т.е. производная вычислялась в диапазоне 244–296 нм.

На графике четвертой производной спектра поглощения БСА в зоне 246–273 нм наблюдается четко выраженная “гребенка” из пяти полос, обусловленная наличием в структуре белка Фен, а в области 278–293 нм расположены частично перекрывающиеся полосы Тир и Трп (рис. 1, 2).

Соотношения содержания ароматических аминокислот у разных белков различны. Из базы данных UniProt [16] известно, что в полипептидную цепь

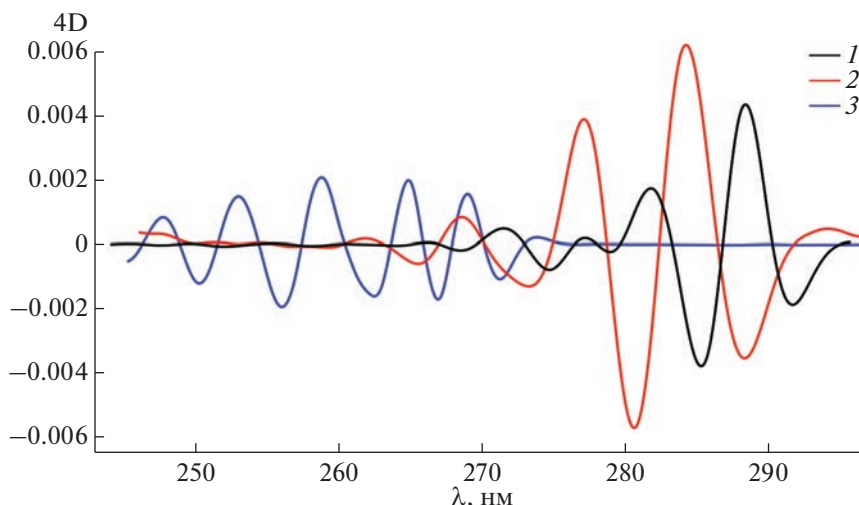


Рис. 2. Четвертые производные спектров поглощения 1 мМ растворов свободных ароматических аминокислот Фен (3), Тир (2), Трп (1) с масштабированием под аминокислотный состав БСА.

зрелой молекулы БСА включены 27 остатков Фен, 20 Тир и 2 Трп. Мы рассчитали четвертые производные спектров поглощения 1 мМ растворов свободных ароматических аминокислот и масштабировали их под аминокислотный состав БСА (рис. 2).

Несмотря на то, что коэффициент молярного поглощения Фен примерно на порядок меньше аналогичных коэффициентов Тир и Трп [12], на четвертых производных спектров Фен идентифицируется отчетливо, поскольку его полосы расположены в более коротковолновой области и практически не перекрываются с частично слившимися полосами Тир и Трп. Кроме того, Фен у большинства белков доминирует количественно [16], что позволяет уверенно констатировать его наличие.

Идея следующего раздела работы заключалась в том, чтобы совместить четвертые производные спектров поглощения нативных белков с комбинацией четвертых производных индивидуальных спектров ароматических аминокислот, то есть искусственно реконструировать картины, полученные в реальных экспериментах, и тем самым под-

твердить работоспособность методов производной УФ-спектрофотометрии. Модельный спектр конструировали из суммы четвертых производных отдельных спектров ароматических аминокислот, взятых в необходимой пропорции.

Исследование показало, что предложенная процедура сравнения требует небольшой корректировки позиционирования четвертых производных спектров аминокислот на шкале длин волн (рис. 3, табл. 1). Спектральные характеристики свободных аминокислот и аминокислот в составе белков немного различаются в силу особенностей структуры белковой глобулы. Кроме того, на спектральный профиль белка может влиять наличие простетической группы. Однако в результате показано хорошее совпадение четвертых производных спектров поглощения нативных белков и их соответствующих реконструкций. Коэффициенты корреляции составили 0.992 для БСА, 0.986 для гемоцианина и 0.909 для гемоглобина, а интенсивность полос ароматических аминокислот в целом отражала количественное их содержание. При этом надо отчетливо понимать, что определение

Таблица 1. Корректировка позиционирования четвертых производных спектров поглощения свободных ароматических аминокислот на шкале длин волн относительно четвертых производных спектров исследованных белков

Белок	Корректировка положения четвертых производных спектров аминокислот на шкале длин волн, нм		
	Фен	Тир	Трп
БСА	1.18	2.24	3.59
Гемоцианин	1.24	2.65	2.59
Гемоглобин	1.00	-0.18	1.82

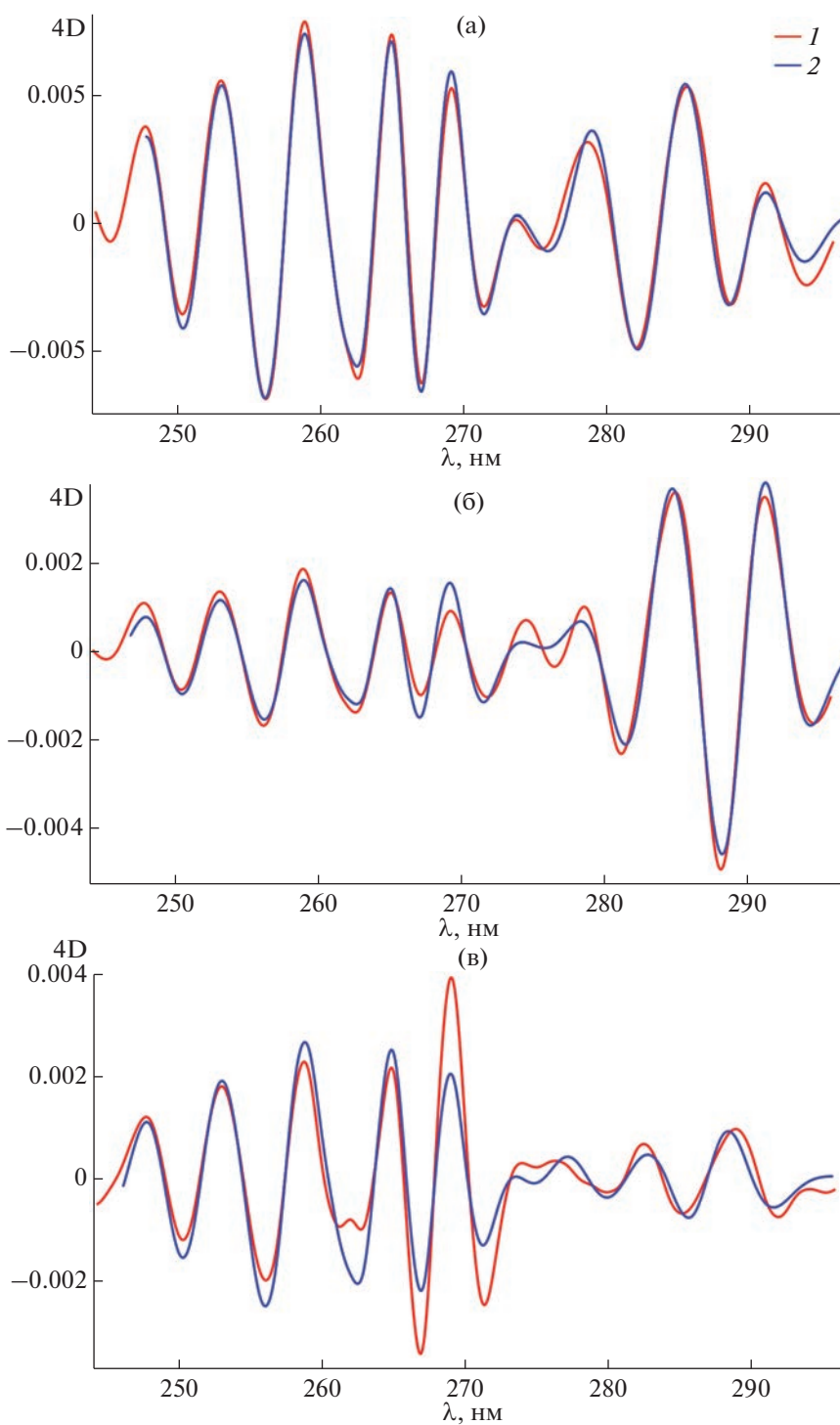


Рис. 3. Сравнение четвертых производных спектров поглощения белков: БСА (а), гемоцианина ахатины (б) и гемоглобина быка (в), и комбинаций четвертых производных спектров свободных ароматических аминокислот. 1 – Четвертая производная спектра поглощения белка, 2 – комбинация четвертых производных спектров ароматических аминокислот.

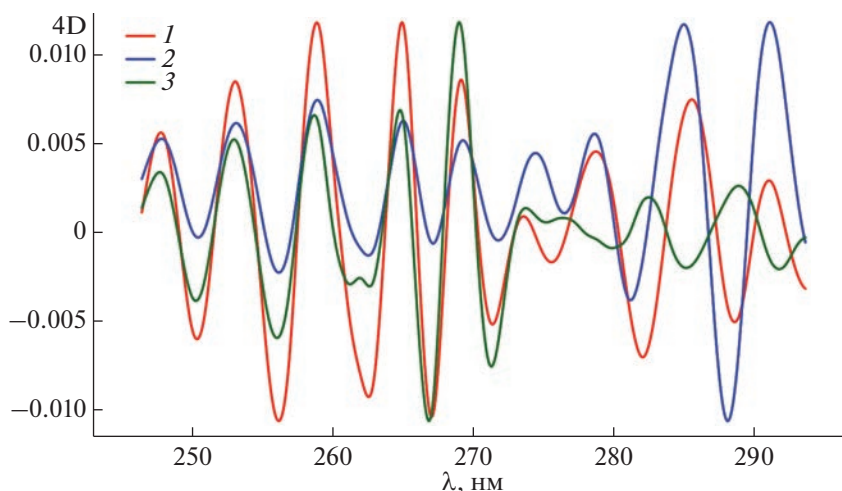


Рис. 4. Сравнение четвертых производных спектров поглощения БСА (1), гемоцианина ахатины (2) и гемоглобина быка (3).

точного аминокислотного состава белков по спектральным данным технически невозможно.

Далее мы попарно сравнили четвертые производные спектров поглощения БСА, гемоцианина и гемоглобина, оценив коэффициенты корреляции для каждой пары белков (рис. 4, табл. 2). Такое сравнение обнаружило существенные расхождения спектральных характеристик всех трех белков в широкой УФ-зоне 240–300 нм. В подвижной частично слившейся зоне поглощения Тир и Трп различия также хорошо заметны. В то же время область поглощения Фен более стабильна, и коэффициент корреляции здесь выше.

Таким образом, нами разработан быстрый неразрушающий способ сравнительного анализа белков методами производной УФ-спектрофотометрии. Экспериментально подобран алгоритм расчетов четвертых производных спектров поглощения белков. На примере растворов БСА, гемоцианина ахатины и гемоглобина быка показана эффективность применения производной УФ-спектрофотометрии при выполнении сравнительного анализа

препаратов нативных белков. Для подтверждения работоспособности метода выполнена реконструкция четвертых производных спектров белков путем комбинации четвертых производных индивидуальных спектров ароматических аминокислот в зоне 240–300 нм. Для наглядной демонстрации различий предложено использовать коэффициент корреляции четвертых производных спектров белков в диапазоне 240–300 нм или в области перекрывания полос поглощения Тир и Трп. Несмотря на то, что в результате нельзя дать точную количественную характеристику содержания отдельных ароматических аминокислот в составе белка, можно сравнивать белки друг с другом, что отвечает поставленной задаче.

Предложенный подход позволяет представить индивидуальный спектральный “портрет” белка, отличающий его от других белков, который затем можно использовать как стандарт при экспериментальной работе с ним.

Таблица 2. Попарное сравнение четвертых производных спектров поглощения БСА, гемоцианина ахатины и гемоглобина быка в разных участках УФ-диапазона

Сравниваемые белки	Диапазоны длин волн, нм		
	246–293 (Фен–Тир–Трп)	246–273 (Фен)	278–293 (Тир–Трп)
	коэффициенты корреляции, r		
БСА/гемоцианин	0.64	0.98	0.61
Гемоцианин/гемоглобин	0.20	0.82	–0.73
Гемоглобин/БСА	0.67	0.87	–0.69

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра “Обсерватория экологической безопасности” Научного парка СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrova T.A., Lyanguzov A.Yu., Malygina N.M. // J. Evol. Biochem. Physiol. 2016. V. 52. P. 37–45.
2. R Project. Reference date: 21.06.2022. <http://cran.r-project.org>
3. Mathews J.H. // Int. J. Math. Educ. Sci. Technol. 2003. V. 34. P. 280–287.
4. Decker H., Hellmann N., Jaenicke E., Lieb B., Meissner U., Markl J. // Integr. Comp. Biol. 2007. V. 47. P. 631–644.
5. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th Edition, N.Y., W.H. Freeman and Company, 2017. 3270 p.
6. Peters T. Jr. All about Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press. 1995. 432 p.
7. EL-Sharif H.F., Aizawa H., Reddy S.M. // Sens. Actuators, B. 2015. V. 206. P. 239–245.
8. van Holde K.E., Miller K.I., Decker H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 15563–15566.
9. Markl J. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1834. P. 1840–1852.
10. Blanc L., Papoin J., Debnath G., Vidal M., Amson R., Telerman A., An X., Mohandas N. // Am. J. Hematol. 2015. V. 90. P. 235–241.
11. Fox D.L. Biochromy of the Mollusca. in The Mollusca. V. 2. Environmental Biochemistry and Physiology / Ed. Hochachka P.W. N.Y., Academic Press, 1983. 362 p.
12. Boysen R.I., Hearn M.T.W. // Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. V. 5. Analysis and Function of Amino Acids and Peptides. / Ed. by B. Hughes A.B., Weinheim, Wiley-VCH, 2012. 508 p.
13. Talsky G. Derivative spectrophotometry / Ed. T. Magner. Weinheim, Wiley, John & Sons, 1994. 228 p.
14. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. // J. Appl. Spectrosc. 2014. V. 80. P. 899–904.
15. Ojeda C.B., Rojas F.S. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2009–2011: a review // Microchem. J. 2013. V. 106. P. 1–16.
16. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2021 // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. D480–D489.

On Particular Regimens of Derivative UV-spectrophotometry for Comparative Analysis of Proteins

A. Y. Lianguzov^{a, *}, N. M. Malygina^{a, b}, A. M. Ivanov^b, and T. A. Petrova^a

^aSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^bKirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia

*e-mail: andrey.lyanguzov@spbu.ru

Bovine serum albumin and two oxygen transport proteins, hemocyanin from the snail *Achatina fulica* and bovine hemoglobin, were used to define what regimens of derivative UV-spectrophotometry are most appropriate for using it as an express technique for nondestructive comparative analysis of native proteins preparations. It was found that the fourth derivatives of proteins absorption spectra make it possible to detect the individual bands of aromatic amino acids in a way optimal for solving certain practical problems. An algorithm for calculating the fourth derivatives was selected experimentally. To verify the approach, the fourth derivatives of the native proteins spectra were reconstructed by combining those of individual aromatic amino acids spectra in the range of 240–300 nm. To demonstrate the individual differences between proteins, it is proposed to use the correlation coefficients of the fourth derivatives of spectra in the range of 240–300 nm or in the wavelength range of tyrosine and tryptophan. Although this approach does not provide for estimating the exact contents of individual aromatic amino acids in proteins, it allows comparing different proteins between each other. The proposed approach makes it possible to obtain an individual spectral “portrait” of a protein, which distinguishes it from other proteins and is useful as a reference for further experimental work with it.

Keywords: proteins absorption spectra, derivative UV-spectrophotometry, bovine serum albumin, hemoglobin, hemocyanin, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, proteins comparative analysis