

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 3, 2022

Гибернация рибосом – молекулярная стратегия выживания бактерий (обзор) <i>Е. А. Хаова, Н. М. Кашеварова, А. Г. Ткаченко</i>	211
Функционирование мембранного белка-транспортера Р-гликопротеина в условиях ингибирования синтеза глутатиона <i>Ю. В. Абаленихина, П. Д. Ерохина, П. Ю. Мыльников, А. В. Шулькин, Е. Н. Якушева</i>	232
Антимикробные свойства и влияние температуры на образование вторичных метаболитов у психрофильных микромицетов <i>А. Е. Куварина, Ю. А. Рошка, Е. А. Рогожин, Д. А. Никитин, А. В. Кураков, В. С. Садыкова</i>	244
Альтернативные пути синтеза цефамандола с использованием биокаталитического ацилирования, катализируемого иммобилизованной синтетазой цефалоспоринов-кислот <i>А. В. Склярченко, И. А. Грошкова, И. Н. Крестьянова, С. В. Яроцкий</i>	253
Продукция диадиноксантина в интенсивной культуре диатомовой водоросли <i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenb.) Reimann et Lewin. и его проапоптотическая активность <i>Р. Г. Геворгуз, М. А. Гуреев, С. Н. Железнова, Е. В. Гуреева, М. В. Нехорошев</i>	264

## Статьи, опубликованные по материалам конференции РосХит 2021 (продолжение)

Механизм деацетилирования хитина и хитозана при длительной щелочной обработке <i>В. Ю. Новиков, И. Н. Коновалова, Н. В. Долгопятова</i>	273
Тромборезистентность полиуретановых пластин, модифицированных кватернизированным хитозаном и гепарином <i>Н. Н. Дрозд, А. П. Луньков, Б. Ц. Шагдарова, Ю. В. Жуйкова, А. В. Ильина, В. П. Варламов</i>	280
Фунгицидная и бактерицидная активность хитозанов с разной молекулярной массой и медных комплексов на их основе <i>Э. В. Попова, Н. М. Коваленко, Н. С. Домнина</i>	287
Применение хитозана в защите пшеницы от болезней и повышении урожайности <i>Л. Е. Колесников, Э. В. Попова, И. И. Новикова, Ю. Р. Колесникова, Е. Д. Балагурова</i>	294
Пути использования салицилата хитозана для повышения биологической эффективности биопрепарата витаплан в отношении <i>Cochliobolus sativus</i> <i>И. И. Новикова, Э. В. Попова, И. Л. Краснобаева, Н. М. Коваленко</i>	302
Использование хитозана для снижения отрицательного воздействия химических веществ на пчел на примере амитраза <i>А. И. Албулов, М. А. Фролова, Э. И. Зелинская, А. К. Елисеев</i>	310

# CONTENTS

---

---

**Vol. 58, No. 3, 2022**

---

---

The Ribosome Hibernation – Molecular Strategy of Bacterial Survival (Review) <i>E. A. Khaova, N. M. Kashevarova, and A. G. Tkachenko</i>	211
Functioning of the P-Glycoprotein Membrane Transport Protein under Conditions of Inhibition of Glutathione Synthesis <i>Yu. V. Abalenikhina, P. D. Erokhina, P. Yu. Mylnikov, A. V. Shchulkin, and E. N. Yakusheva</i>	232
Antimicrobial Properties and Effect of Temperature on the Formation of Secondary Metabolites in Psychrophilic Micromycetes <i>A. E. Kuvarina, Yu. A. Roshka, E. A. Rogozhin, D. A. Nikitin, A. V. Kurakov, and V. S. Sadykova</i>	244
Alternative Synthesis of Cefamandole Using Biocatalytic Acylation Catalyzed by Immobilized Cephalosporin-Acid Synthetase <i>A. V. Sklyarenko, I. A. Groshkova, I. N. Krestyanova, and S. V. Yarotsky</i>	253
Production of Diadinoxanthin in Intensive Culture of the Diatomaceous Alga <i>Cylindrotheca closterium</i> (Ehrenb.) Reimann et Lewin. and Its Pro-Apoptotic Activity <i>R. G. Gevorgiz, M. A. Gureev, S. N. Zheleznova, E. V. Gureeva, and M. V. Nechoroshev</i>	264

---

## **Articles published based on the materials of the RosHit 2021 conference (continued, beginning #2)**

The Mechanism of Chitin and Chitosan Deacetylation during Long-Term Alkaline Treatment <i>V. Yu. Novikov, I. N. Konovalova, and N. V. Dolgopyatova</i>	273
Thromboresistance of Polyurethane Plates Modified with Quaternized Chitosan and Heparin <i>N. N. Drozd, A. P. Lunkov, B. Ts. Shagdarova, Yu. V. Zhuikova, A. V. Il'ina, and V. P. Varlamov</i>	280
Fungicidal and Bactericidal Activity of Chitosans with Different Molecular Weights and Copper Complexes Based on Them <i>E. V. Popova, N. M. Kovalenko, and N. S. Domnina</i>	287
The Chitosan Application in Wheat Protection from Diseases and Yield Increasing <i>L. E. Kolesnikov, E. V. Popova, I. I. Novikova, Yu. R. Kolesnikova, and E. D. Balagurova</i>	294
Using Chitosan Salicylate for Increasing Vitaplan Biological Efficiency <i>I. I. Novikova, E. V. Popova, I. L. Krasnobaeva, and N. M. Kovalenko</i>	302
The Use of Chitosan for Reducing the Negative Impact of Chemicals on Bees on the Example of Amitraz <i>A. I. Albulov, M. A. Frolova, E. I. Zelinskaya, and A. K. Eliseev</i>	310

---

---

УДК 579.222

## ГИБЕРНАЦИЯ РИБОСОМ – МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ (ОБЗОР)

© 2022 г. Е. А. Хаова<sup>1, 2</sup>, Н. М. Кашеварова<sup>1</sup>, А. Г. Ткаченко<sup>1, 2, \*</sup><sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов ПФИЦ УрО РАН, Пермь, 614081 Россия<sup>2</sup>Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

\*e-mail: agtkachenko@iegm.ru

Поступила в редакцию 09.09.2021 г.

После доработки 03.01.2022 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

В обзоре рассмотрены механизмы поддержания жизнеспособности бактерий при неблагоприятных воздействиях, основанные на индукции факторов гибернации рибосом, вызывающих торможение синтеза белка посредством подавления функций рибосом. К факторам гибернации относятся рибосом-связывающие белки, инактивирующие 70S рибосомы (RaiA), формирующие неактивные 100S димеры рибосом (RMF, HPF) или действующие в различных фазах трансляционного цикла (RsfS, YqjD, SRA, EttA). Под воздействием факторов гибернации у части клеток популяции формируется дормантное состояние, характеризующееся низкой скоростью метаболических процессов. Это придает им свойство толерантности и, как следствие, способность к персистенции в присутствии антибиотиков и стрессов. Обсуждается роль метаболических факторов (полиамины, индолы) в регуляции уровня экспрессии генов гибернации.

**Ключевые слова:** бактерии, стресс, гибернация рибосом, метаболизм, адаптация, антибиотики, толерантность, персистенция

**DOI:** 10.31857/S0555109922030060

Синтез белка представляет собой один из фундаментальных процессов, составляющих основу жизнедеятельности всех организмов. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последнее время в понимании функционирования белоксинтезирующего аппарата, многие его аспекты все еще нуждаются в изучении. Это, в частности, касается ответной реакции со стороны рибосом на разнообразные изменения условий внутренней и внешней среды, воздействующих на бактерии и ведущих к остановке роста и переходу части клеток популяции в дормантное (“дремлющее”) состояние [1]. Покоящиеся дормантные клетки характеризуются замедлением процессов метаболизма, образования энергии, биосинтеза и пролиферации, на которые воздействует большинство антибиотиков. В таких условиях антибиотики теряют активность, в результате чего дормантные клетки приобретают толерантность и способность персистировать, то есть сохранять жизнеспособность при воздействии антибиотиков и стрессов. В отличие от антибиотикорезистентных клеток, имеющих генетическую природу устойчивости, персистерное состояние формируется как результат физиологических отклонений метаболизма.

Одним из наименее изученных аспектов образования дормантных клеток является роль факто-

ров гибернации рибосом в регуляции функции рибосом в ответ на стрессы и действие антибиотиков [2]. Известно, что около 60% глобальной биомассы микроорганизмов, находящихся в естественных условиях, испытывают постоянное голодание и воздействие других стрессорных факторов, способствующих формированию у них состояния покоя [3, 4]. Когда бактерии подвергаются неблагоприятным воздействиям, происходит замедление или полная остановка роста за счет действия специализированных механизмов, обеспечивающих снижение скорости энергоемких биосинтетических процессов. При этом в клетках поддерживается минимально необходимый базовый уровень трансляции, за счет которого обеспечивается синтез связанных с рибосомами факторов, ответственных за снижение активности клеток. Часть из них вовлечена в процесс гибернации рибосом [5]. Факторы гибернации отвечают за ингибирование рибосом и снижение активности трансляции, которая восстанавливается при возврате клеток к оптимальным условиям. Структурно-функциональное разнообразие факторов гибернации и формируемых ими неактивных рибосомальных структур, по-видимому, имеет значение для специфической адап-

тации клеток к разнообразным стрессам и воздействию антибиотиков.

Первооткрыватели персистенции связывали ее формирование с замедлением скорости метаболических процессов и развитием дормантности без изменения генетических свойств бактерий [6]. Представления о природе персисторного состояния как следствия развития дормантности претерпевали изменения в связи с интенсивным развитием направления, связанного с изучением генетической природы адаптации бактерий, а также химической природы сигналов, формируемых в ответ на стресс [7, 8].

**Концепция дормантности как фактора формирования персистенции.** В настоящее время точка зрения о дормантном состоянии как основной причине образования персисторных клеток вновь становится преобладающей [9, 10]. Во время экспоненциального роста у незначительной части клеток ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$ ) генетически гомогенной бактериальной популяции формируется дормантное состояние за счет случайных (стохастических) отклонений в уровне экспрессии некоторых генов, в частности, кодирующих глобальные регуляторы метаболических процессов [11–13]. В основе объяснения причины этих отклонений лежит концепция бистабильности генной экспрессии, согласно которой различные гены за счет случайных флуктуаций способны переходить из активного состояния в неактивное [13, 14]. При этом случайное сочетание отклонений метаболизма в различных дормантных клетках, по-видимому, является основной причиной формирования их фенотипической гетерогенности.

Постоянное присутствие в бактериальной популяции фенотипически гетерогенных дормантных клеток, способных пережить воздействие антибиотиков и стрессов, привело к формированию концепции уменьшения риска (bet-hedging) как эволюционной стратегии выживания генетически однородной популяции в динамически изменяемом окружении [15]. Таким образом, в популяции еще до начала летального воздействия присутствует некоторое количество дормантных клеток, способных к персистенции, что страхует ее от полного уничтожения.

Коллектив авторов, руководимый Balaban [16, 17], относит процесс формирования стохастических персисторов к спонтанной персистенции (spontaneous persistence), а образуемые при этом персисторы предлагают обозначать как персисторы Типа II. В отличие от них, персисторы Типа I образуются в результате так называемой индуцируемой персистенции (triggered persistence), например, в результате развития дормантного состояния в ответ на комплексное воздействие стрессов, формируемых при переходе клеток в стационарную фазу [18]. В реализации

данного механизма участвуют такие компоненты стрессорного ответа, как активные формы кислорода, повреждающие ДНК и индуцирующие SOS ответ [19], RpoS ( $\sigma^S$ -субъединица РНК-полимеразы) [20, 21], (p)ppGpp как основной регулятор стринджен-ответа [22, 23] и другие [24]. Молекулярные механизмы, принимающие участие в образовании дормантных клеток, могут действовать кооперативно, что приводит к фенотипической гетерогенности групп дормантных клеток, обладающих толерантностью к различным стрессам [25–27]. Экспериментальное исследование персистенции часто связано с использованием модели перехода периодической культуры бактерий в стационарную фазу [28]. При этом сопутствующие стрессы индуцируют факторы, формирующие дормантное состояние, включая факторы гибели рибосом, что приводит к возрастанию численности субпопуляции персисторных клеток на несколько порядков (индуцируемая персистенция).

В последнее время к идее самодостаточности дормантного состояния как причины развития персистенции стали возвращаться в связи с развитием методов изучения молекулярных механизмов на уровне индивидуальной клетки [29]. На основании результатов использования этих методов предложена концепция глубины дормантности (dormancy depth), от которой, как считают авторы, зависит способность бактериальной клетки формировать персисторное состояние [30].

Известно, что спустя некоторое время после переноса в оптимальные условия (лаг-период), дормантные клетки способны “оживать” (resuscitate) и возобновлять рост (regrowth). Продолжительность лаг-периода ( $T_{\text{regrowth}}$ ) прямо пропорциональна глубине дормантности, которая зависит от степени выраженности метаболических изменений, обуславливающих уровень толерантности бактериальных клеток к антибиотикам и их способность к персистенции. Согласно данным, полученным на *Escherichia coli*, сравнительно низкие уровни дормантности имеют персисторные клетки, обозначенные как persister-FR (Fast Regrowth), то есть персисторы, быстро возобновляющие рост ( $T_{\text{regrowth}} < 12$  ч), и persister-SR (Slow Regrowth) – персисторы, медленно возобновляющие рост ( $12 \text{ ч} < T_{\text{regrowth}} < 40$  ч). Максимальный уровень глубины дормантности характерен для жизнеспособных, но некультивируемых клеток (VBNC, viable but non-culturable), которые могут пребывать в этом состоянии практически неограниченное время, но имеют значение  $T_{\text{regrowth}} > 3$  сут [30].

В модели перехода бактерий из экспоненциальной фазы в стационарную глубина дормантности возрастает пропорционально времени пребывания клеток в стационарной фазе, вплоть до формирования у них VBNC состояния [31–33].

Количество dormantных клеток в периодической культуре *E. coli* достигает максимума к 24 ч культивирования, после чего наблюдается снижение их численности. При этом после 48 ч пребывания клеток *E. coli* в стационарной фазе в популяции появляются VBNC клетки [34].

Механизм перехода бактерий в dormantное состояние связывают с образованием внутриклеточных структур, “агресом”, которые представляют собой высокомолекулярные белковые агрегаты, состоящие из белков, участвующих в основных метаболических путях. При этом активность катализирующих метаболические превращения ферментов в значительной степени утрачивается при их включении в структуру агресомы, что рассматривается как основная причина развития dormantности. Наряду с белковыми агрегатами, клетки *E. coli*, испытывающие стрессорные воздействия, характеризуются также способностью образовывать несколько типов ДНК агрегатов в комплексе с ДНК-связывающими белками DPS (DNA-binding protein of starvation) [35].

В результате процессов агрегации образуется популяция структурно и функционально гетерогенных dormantных клеток, способных выживать в специфических условиях меняющейся среды. Восстановление нормального вегетативного состояния клеток сопровождается переходом белков агресомы в растворенное состояние, условием которого является достаточный уровень энергии, необходимой для функционирования шаперонов и протеаз, ответственных за данный процесс [36].

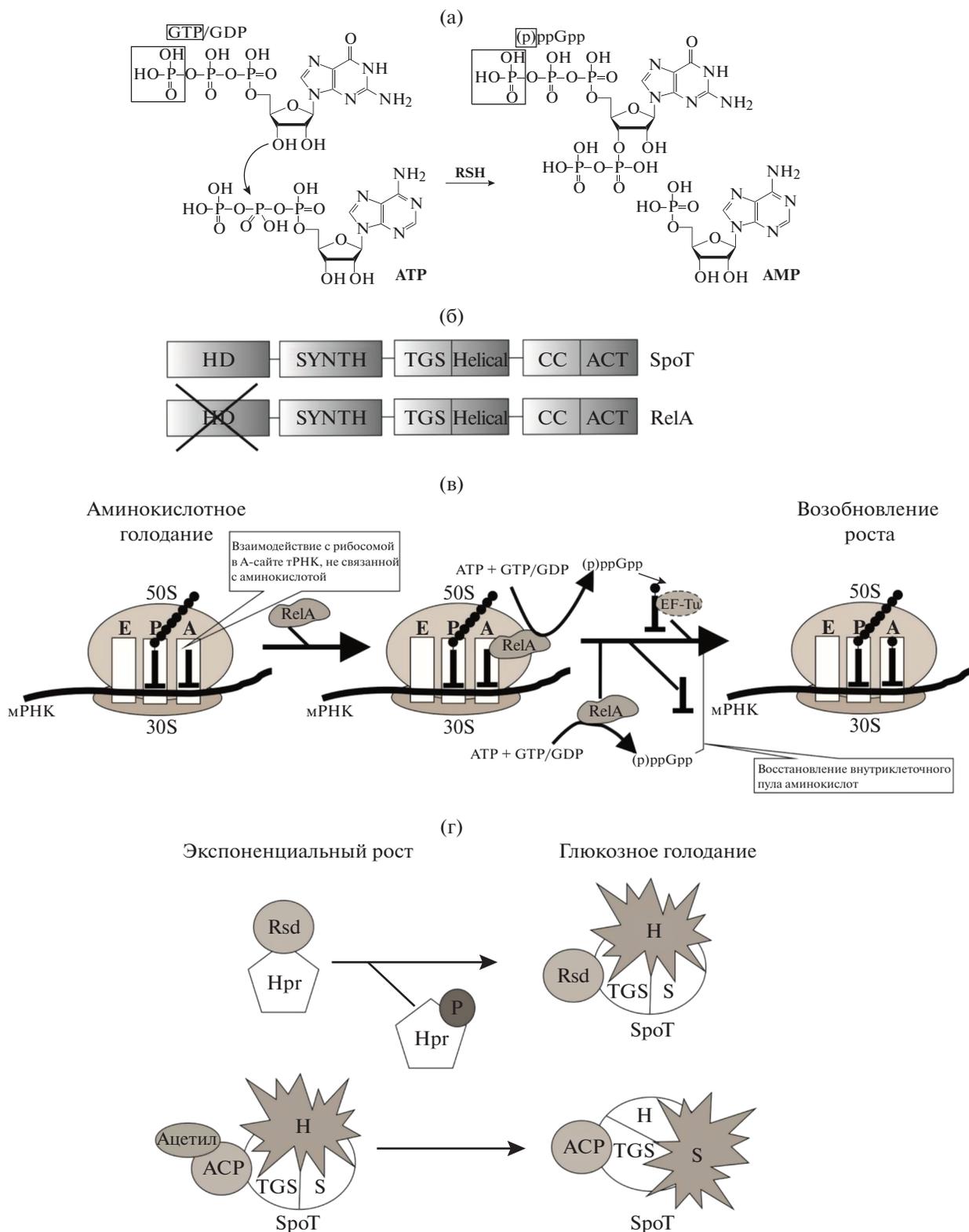
В последнее время функция АТФ как источника энергии для осуществления переходов между dormantным и вегетативным состояниями бактериальных клеток существенно дополнена его свойствами как одного из наиболее эффективных биологических гидротропов, ответственных за поддержание нормальной обводненности белковых поверхностей и, соответственно, рефолдинга белков [37]. На основании данных о влиянии интенсивности метаболических процессов на вязкость и текучесть отдельных участков цитоплазмы считают, что уровень энергетического состояния клеток играет существенную роль в образовании и растворении белковых агрегатов [38]. При этом низкие энергетические потоки способствуют переходу макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты) в агрегированное состояние и формированию dormantности.

Таким образом, персистеры представляют собой субпопуляцию фенотипически гетерогенных бактериальных клеток, временно утративших способность к пролиферации за счет переходов в dormantное состояние, что делает их способными переживать концентрации антибиотиков, летальные для основной части популяции, и возобновлять рост и размножение при переносе в оптимальные усло-

вия [39]. Это позволяет всей популяции поддерживать жизнеспособность на уровне, достаточном для появления и отбора более редких наследственно закрепленных мутаций резистентности к антибиотикам [40–42]. Резистентные клетки, в отличие от персистеров, способны размножаться в присутствии антибиотиков, что резко повышает возможность их распространения в окружающей среде и осложняет задачу борьбы с инфекцией.

**Согласованное изменение транскрипционно-трансляционного аппарата бактериальной клетки – основа формирования персистенции.** Существенную роль в персистообразовании играют метаболические процессы, которые изменяются в ответ на воздействие стрессов стационарной фазы. В этот период формируются стрессорные ответы на голодание, накопление токсических продуктов обмена, закисление, окислительный стресс и другие неблагоприятные факторы. Перечисленные процессы приводят к изменению типа генной экспрессии, уровень которой при этом снижается до 10% от значения, характерного для экспоненциального роста, с преобладанием экспрессии генов стационарной фазы [43] и реорганизацией генома внутри нуклеоида [44, 45].

В ответ на исчерпание сахаров, транспортируемых в клетку посредством фосфотрансферазной системы (ФТС сахаров), и стресс голодания, который сопровождается снижением синтеза аминокислот, в клетке формируется стринджен-ответ (рис. 1). Он представляет собой согласованное торможение биосинтеза белков, ДНК, РНК, пептидогликана, что сопровождается значительным замедлением скорости роста, приводящим к сбережению энергии в условиях голодания [46–48]. Ключевым регулятором стринджен-ответа является гуанозинтетра(пента)фосфат (p)ppGpp, который играет роль сигнала тревоги (alarm) и на этом основании отнесен к группе соединений алармонов (рис. 1а). Ответственными за поддержание определенного уровня (p)ppGpp в клетках *E. coli* являются стринджен-факторы – белки-ферменты RelA и SpoT. Первый из них синтезирует (p)ppGpp при взаимодействии тРНК, не связанной с аминокислотой, с рибосомой, т.е. в ответ на аминокислотное голодание, второй, в дополнение к менее выраженной (p)ppGpp-синтетазной, обладает также более значительной гидролазной активностью (рис. 1б, 1в). Аминокислотное голодание приводит к накоплению в цитоплазме клетки тРНК, не связанных с аминокислотами, которые взаимодействуют с А-сайтом рибосом. Такое состояние рибосомы распознается RelA белком, который, связываясь с 50S субъединицей рибосомы, инициирует синтез (p)ppGpp. После диссоциации RelA из рибосомального комплекса синтез может быть продолжен. Высокое содержание (p)ppGpp в клетках мобилизует метаболические ресурсы на восполнение клеточного пула аминокислот, что



**Рис. 1.** Стринджент-ответ, структура и регуляция активности факторов, ответственных за его формирование в бактериальных клетках: а – синтез гуанозинтетрафосфата и гуанозинпентафосфата, (p)ppGpp, в реакциях, катализируемых семейством белков RSH (RelA-SpoT homologue); б – доменная структура SpoT и RelA. Домены белков представлены в порядке, отражающем их относительное расположение в белковой молекуле: гидролитический (HD), синтетический (SYNTH), регуляторные (TGS, CC, ACT). Перечеркиванием обозначено отсутствие гидролазной активности; в – механизм активности RelA; г – механизм регуляции (p)ppGpp-гидролазной и -синтезазной активностей SpoT при глюкозном голодании. Пояснения к рисунку приводятся в тексте.

приводит к образованию ацилированных тРНК, их переносу с помощью фактора элонгации EF-Tu в А-сайт рибосом и возобновлению трансляции. Синтезная активность SpoT изменяется при отклонении удельной скорости элонгации пептидной цепи от максимальной [49, 50]. В регуляции соотношения синтезной и гидролазной активностей SpoT принимают участие также белки-регуляторы метаболизма, такие как ACP, Rsd и HPr [51–53].

В настоящее время показано, что, наряду с адаптацией к стрессу голодания, стринджен-ответ вносит существенный вклад в регуляцию многих внутриклеточных процессов, связанных с ростом, вторичным метаболизмом, вирулентностью, биопленкообразованием и персистенцией. Основным его регулятором, (p)ppGpp, вызывает глубокие изменения транскрипции, подавляя синтез стабильных РНК и индуцируя экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза аминокислот и факторы стрессорного ответа. В клетках *E. coli* идентифицировано более 50 мишеней для (p)ppGpp [54]. Действие этого алармона затрагивает около 500 генов и направлено на предотвращение бесполезной траты ресурсов при неблагоприятных воздействиях [50, 55, 56].

К наиболее энергоемким процессам метаболизма относится синтез белка. Поэтому одной из мишеней (p)ppGpp являются рибосомальные структуры на уровне регуляции экспрессии генов рибосомальных РНК, *rrnB*. Особенностью их промоторной области является присутствие богатой ГЦ основаниями “дискриминаторной” последовательности, связывание которой с (p)ppGpp приводит к дестабилизации открытия промоторов и ингибированию инициации транскрипции [57].

Реорганизация метаболических процессов при формировании дормантного и персисторного состояний в значительной степени обусловлена заменой основной вегетативной  $\sigma^D$ -субъединицы РНК-полимеразы ( $\sigma^{70}$ , RpoD) на альтернативные, в первую очередь  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ , RpoS – фактор общего стрессорного ответа), которая отвечает за избирательную транскрипцию генов адаптации клеток к многочисленным стрессам стационарной фазы [45]. Основным фактором, ответственным за происходящие замены, является антисигма-фактор Rsd (регулятор  $\sigma^D$ -субъединицы) [58]. Через него осуществляется регуляция не только транскрипционного профиля стационарных клеток, но и их метаболизма. Rsd способен образовывать комплекс с  $\sigma^D$ -субъединицей РНК-полимеразы, что приводит к ее инактивации и замене на специфическую для стационарной фазы  $\sigma^S$ -субъединицу в составе холофермента [59].

Наряду с заменой вегетативной  $\sigma^D$ -субъединицы РНК-полимеразы на альтернативные субъединицы, Rsd способен, взаимодействуя с SpoT, сдвигать баланс его (p)ppGpp-синтезной и гидролазной активностей в сторону последней (рис. 1г).

Однако это может происходить только в условиях глюкозного голодания [51]. Во время же нормального роста Rsd присутствует в клетках в неактивном состоянии в связанной форме с гистидин-содержащим белком HPr, переносчиком фосфатной группы к ФТС сахарам. HPr способен также взаимодействовать с различными белками, оказывая регуляторный эффект на широкое разнообразие реакций углеродного и энергетического метаболизма [60]. В отсутствие глюкозного голодания HPr, находясь преимущественно в дефосфорилированной форме, способен связывать Rsd и удерживать его от взаимодействия с другими белками, в том числе с SpoT (рис. 1г). Преобладание фосфорилированного состояния HPr при истощении в среде глюкозы приводит к высвобождению Rsd, что открывает ему возможность, взаимодействуя с SpoT, сдвигать баланс активности в сторону гидролиза (p)ppGpp [51, 52, 61].

Обратный эффект описан для ацил-переносщего белка ACP (рис. 1г). Истощение глюкозы сопровождается снижением пула ацетил-CoA и жирнокислотным голоданием, во время которых ACP переходит в деацилированное состояние и при связывании с SpoT усиливает его синтезную активность [52, 53]. Наоборот, в условиях экспоненциального роста ACP присутствует в ацилированной форме и, связываясь с SpoT, сдвигает баланс его активности в сторону гидролиза (p)ppGpp. Предполагается, что Rsd и ACP могут конкурировать между собой за связывание с SpoT во время голодания, оптимизируя при этом клеточный уровень (p)ppGpp [52].

Показано, что чрезмерно высокая концентрация алармона в клетке значительно ограничивает синтез рибосом, тогда как слишком низкое его содержание лимитирует уровень метаболических белков *E. coli* [62]. Действие Rsd, ACP, HPr и, возможно, других регуляторных белков в конечном итоге направлено на поддержание концентрации (p)ppGpp, оптимальной для обеспечения нормального уровня экспрессии генов, ответственных за адаптацию к стрессу, в том числе генов гибернации рибосом и, следовательно, перистообразования как механизма адаптации бактерий к разнообразным стрессам [10].

Таким образом, наряду со стрессорными ответами, белок-белковые взаимодействия между Rsd, HPr, ACP и SpoT способствуют сохранению согласованного действия процессов транскрипции и трансляции во время стационарной фазы [43].

**Гибернация рибосом – основной механизм регуляции синтеза белка в формировании персистенции.** Одним из наиболее действенных механизмов, приводящих к быстрой инактивации уже присутствующих в клетке рибосом при переходе бактерий

в стационарную фазу, является индукция факторов гибернации рибосом, синтез которых положительно регулируется (p)ppGpp [2, 63]. Факторы гибернации формируют неактивные рибосомальные структуры, 70S мономеры и 100S димеры [43, 64, 65], а также осуществляют другие способы ингибирования рибосом на различных стадиях трансляции. В результате этого в клетках стационарной фазы образуются рибосомальные комплексы с разной трансляционной активностью. Это дает возможность бактериям оперативно реагировать на изменения условий окружающей среды.

Действие факторов гибернации рибосом приводит к остановке роста клетки, при этом бактерии сохраняют способность к его возобновлению в течение 1–2 мин после возврата клеток к нормальным условиям. Показано, что делеция генов, кодирующих факторы гибернации рибосом, приводит к уменьшению выживаемости клеток в стационарной фазе роста и при воздействии различных видов стресса, а также к снижению толерантности к антибиотикам [2]. Кроме того, максимальный уровень экспрессии генов гибернации рибосом наблюдается во время перехода периодической культуры *E. coli* в стационарную фазу [5, 21, 66]. Однако функциональная активность белков гибернации, отвечающих за их выход из комплекса с рибосомами и возобновление роста дормантных клеток при переносе культуры в свежую среду, возрастает пропорционально длительности их пребывания в стационарной фазе [5]. Это указывает на возможность того, что факторы гибернации рибосом могли бы участвовать в регуляции длительности периода “пробуждения”, а следовательно, и глубины дормантности бактериальных клеток [30].

Поскольку мишенью воздействия факторов гибернации являются рибосомы, знание структурно-функциональных особенностей этих оргanelл важно для понимания механизма действия факторов гибернации.

Как известно, рибосома представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс, состоящий из двух субъединиц: большой 50S и малой 30S. Большая субъединица содержит около 30 рибосомальных белков, 23S рРНК и 5S рРНК, тогда как малая субъединица состоит из 21 рибосомального белка и 16S рРНК. На границе между двумя субъединицами локализованы участки рибосомальных РНК. Малая субъединица связывает мРНК благодаря расположению в ней фрагмента 16S рРНК, комплементарного последовательности Шайна-Дальгарно (SD) мРНК. Рибосома содержит 3 сайта связывания тРНК: А-, Р- и Е-сайты. В А-сайте связывается аминоацил-тРНК, комплементарная кодону мРНК.

Большая субъединица содержит в себе каталитический центр рибосомы, где происходит фор-

мирование пептидной связи между синтезирующейся пептидной цепочкой, связанной с тРНК в Р-сайте, и аминокислотным остатком, связанным с тРНК в А-сайте. После пептидилтрансферной реакции происходит транслокация, в результате которой тРНК, не связанная с аминокислотой, временно находится в Е-сайте перед ее выходом из рибосомального комплекса.

Трансляция состоит из 3 основных стадий: инициации, элонгации, терминации (рис. 2). На первой стадии формируется 70S инициаторный комплекс, который состоит из большой и малой субъединиц, мРНК и инициаторной формил-метионил-тРНК, связанной в Р-сайте. В течение элонгации происходит включение аминокислотных остатков в растущую пептидную цепь. Рибосомальный комплекс, перемещающийся вдоль мРНК, в конечном итоге приходит в контакт со стоп-кодоном, индуцирующим терминацию, что приводит к высвобождению синтезированного полипептида.

Протекание всех стадий трансляции обеспечивается вспомогательными факторами (рис. 2). Первая стадия трансляции обслуживается тремя факторами инициации: IF1, IF2 (ГТФаза) и IF3, происходит за счет использования энергии гидролиза фосфатной группы ГТФ и завершается образованием комплекса 30S и 50S субъединиц на мРНК с загруженной инициаторной тРНК в Р-сайте. Данные факторы модулируют аффинность Р-сайта по отношению к инициаторной формил-метионил-тРНК и настраивают сборку инициаторного комплекса для обеспечения точного начала синтеза белка. На стадии элонгации функционируют два фактора, являющиеся ГТФазами: EF-Tu и EF-G. Первый из них обеспечивает точный подбор аминоацил-тРНК и формирование пептидной связи, после чего второй способствует транслокации. Завершается трансляция благодаря функционированию факторов RF1 и RF2, которые стимулируются третьим фактором – ГТФазой RF3 и специфично распознают различные стоп-кодона [2, 67]. Терминация завершается освобождением вновь синтезированного полипептида после распознавания стоп-кодона. Рециклирующий фактор рибосом RRF совместно с фактором элонгации EF-G подготавливают трансляционный аппарат для последующих процессов инициации (рециклирование).

**Механизмы действия факторов гибернации рибосом.** Гибернация рибосом почти повсеместно встречается у бактерий, а также в пластидах растений [68]. Стрессорные воздействия или переход бактериальных клеток в стационарную фазу сопровождаются прекращением роста и диссоциацией части рибосом на быстро деградирующие 30S и накапливающиеся по мере голодания 50S субъединицы [5]. Кроме того, значительные из-

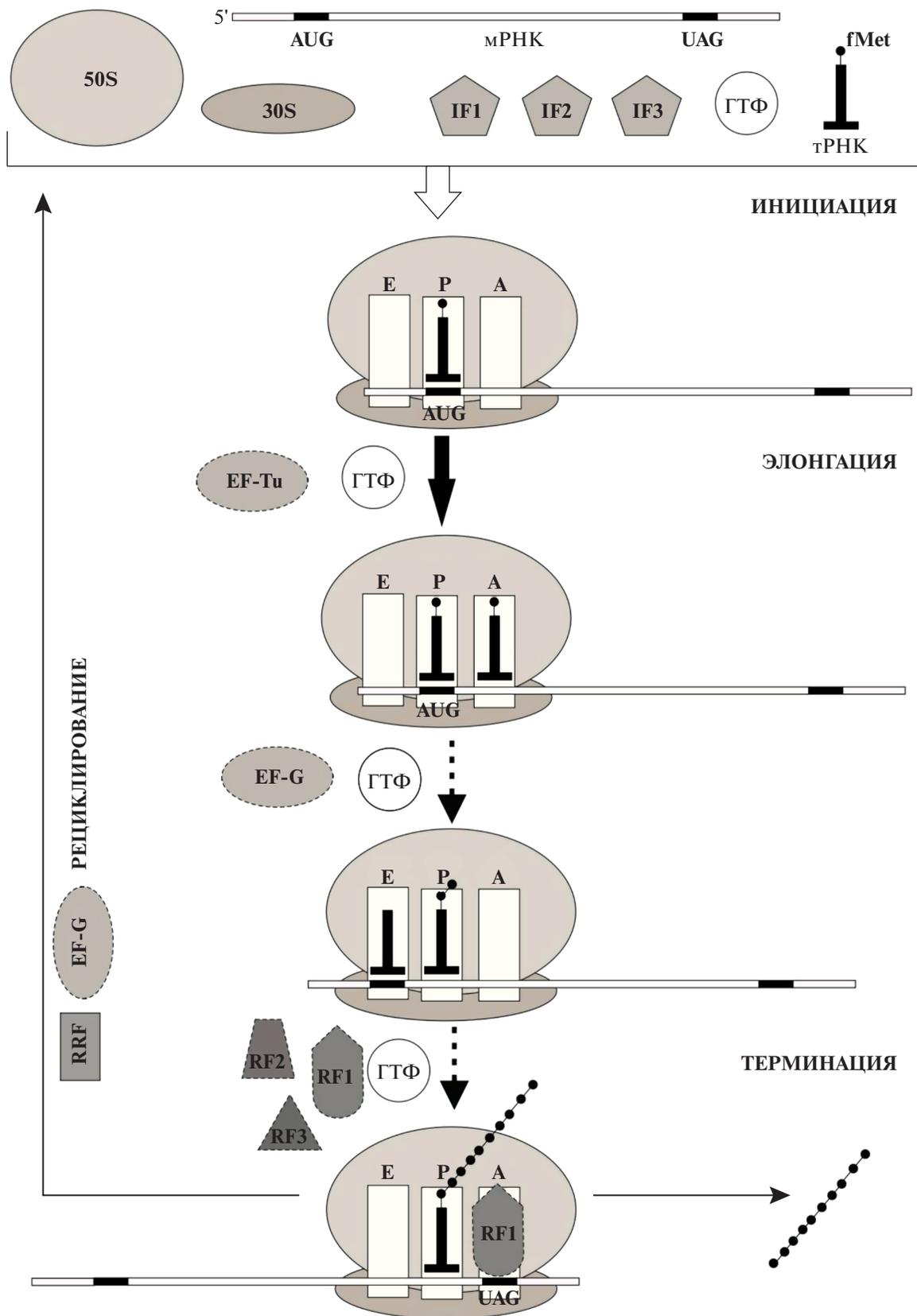


Рис. 2. Схема цикла трансляции у прокариот. Пояснения к рисунку приводятся в тексте.

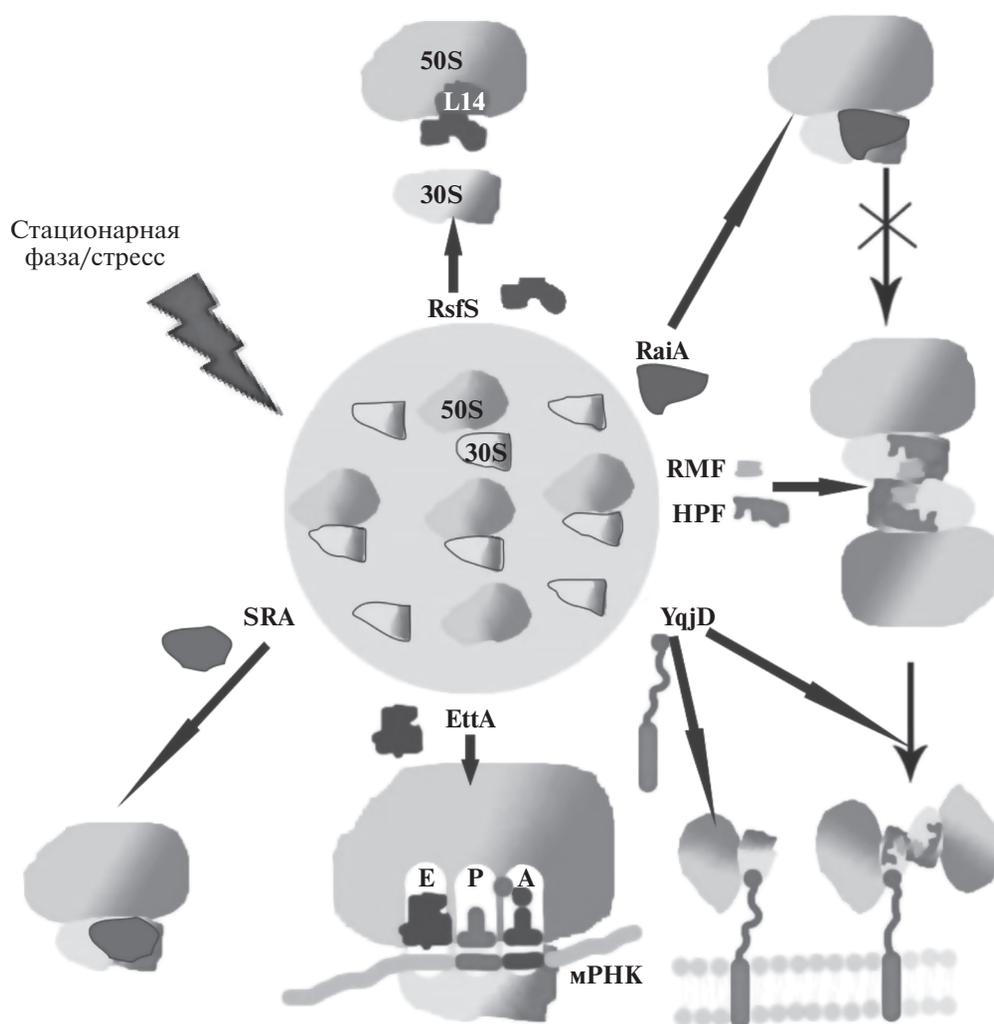


Рис. 3. Механизмы действия факторов гибернации рибосом *E. coli*. Пояснения к рисунку приводятся в тексте.

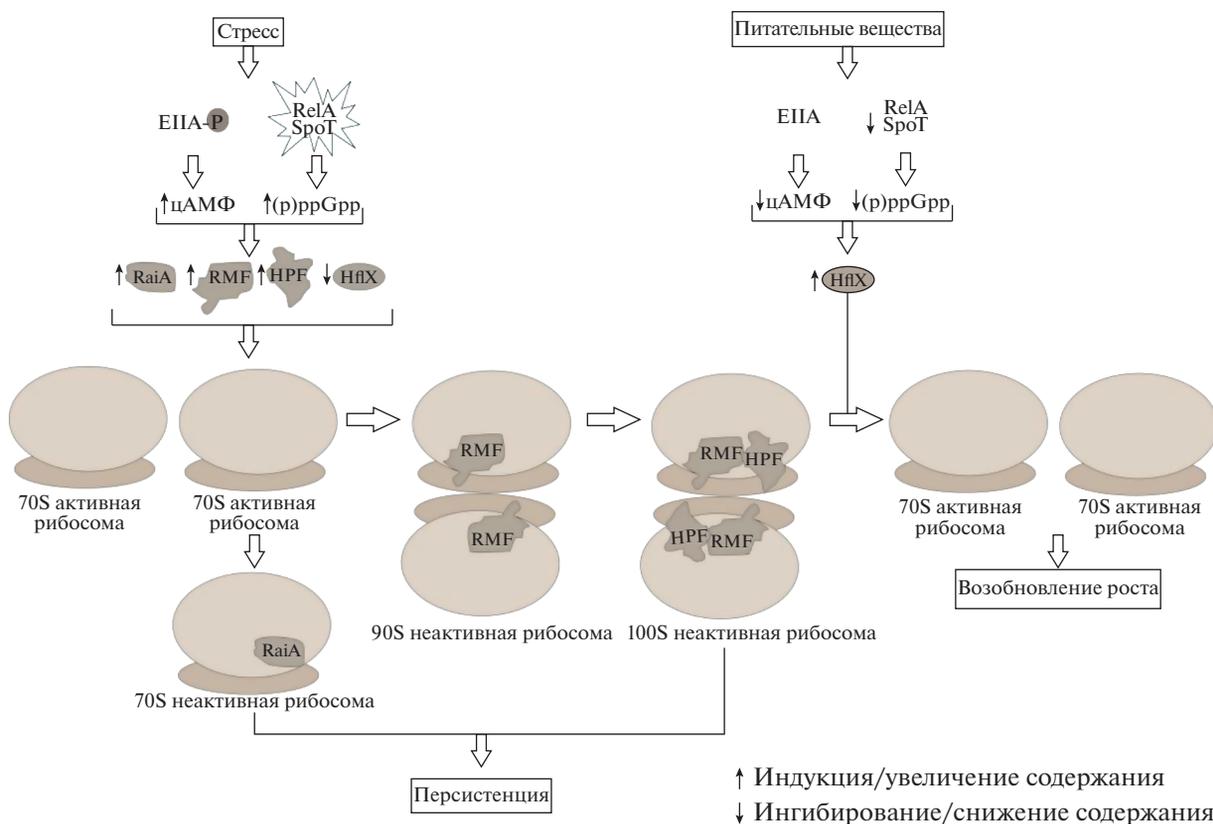
менения трансляционного аппарата при стрессе обусловлены димеризацией 70S рибосом с образованием неактивных 100S комплексов (рис. 3) [69]. 100S димеры, отсутствующие в экспоненциальной фазе, формируются при переходе в стационарную фазу и далее сохраняются на всем ее протяжении [70–73]. Они могут составлять до 40–60% от общего содержания рибосом в клетке [2, 73]. 100S димеры способны быстро диссоциировать на отдельные 70S рибосомы в течение 1 мин после наступления благоприятных условий [71, 74, 75].

У *E. coli* (как и остальных представителей гаммапротеобактерий) 100S димеры формируются под воздействием двух факторов гибернации: RMF (Ribosome Modulation Factor) и HPF (Hibernation Promoting Factor) [76] (рис. 3). RMF формирует 90S промежуточный димер, который далее преобразуется, благодаря действию HPF, в зрелый 100S димер [77] (рис. 4). В составе 100S комплекса мономеры взаимодействуют друг с дру-

гом посредством 30S субъединиц, связанных при участии RMF, расположенного в непосредственной близости к рибосомальным белкам S13, L13, L2 и P-сайту [78].

Известно, что делеция гена *rmf* приводит к неспособности бактерий формировать 100S рибосомальные димеры [79]. Несмотря на кажущуюся вспомогательную роль HPF, делеционный мутант по данному фактору также не образует 100S димеры.

Действие третьего фактора гибернации рибосом RaiA (Ribosome-Associated Inhibitor A), прежние названия YfiA и rY, обусловлено его способностью связываться с 70S рибосомами и инактивировать их трансляционную функцию. Предполагается, что RaiA обладает антагонистическими свойствами по отношению к фактору HPF, препятствуя его связыванию с рибосомами, тем самым сдвигая баланс между 100S димерами и неактивными 70S мономерами в сторону последних. Как известно, HPF и RaiA на 40% гомоло-



**Рис. 4.** Модель формирования персистеров *E. coli* при участии факторов гибернации. Пояснения к рисунку приводятся в тексте.

гичны по аминокислотной последовательности [71], а также имеют общий сайт связывания с рибосомами [69], что может быть причиной конкурентных отношений между ними. При этом RaiA, взаимодействуя с рибосомами, блокирует их А- и Р-сайты [80], чему способствует его удлиненный С-терминальный домен, который, кроме того, препятствует связыванию RMF с рибосомой и, следовательно, подавляет образование димеров (рис. 3, 4). Кроме того, сайт связывания RaiA перекрывается с сайтами связывания факторов IF1, IF3, EF-G, тем самым нарушая нормальное протекание процессов инициации и элонгации [69]. Эти особенности структуры и локализации RaiA обуславливают его способность стабилизировать и инактивировать 70S рибосомы [81]. Это подтверждается тем, что в делеционных мутантах *ΔraiA* содержание 100S рибосом выше, чем в клетках дикого типа [71]. Таким образом, способность бактерий образовывать различные рибосомальные комплексы – RMF-HPF-100S или RaiA-70S – обуславливает присутствие в клетках гетерогенных неактивных рибосомальных структур, что, предположительно, делает их специфичными для формирования персистеров, толерантных к определенным антибиотикам и стрессам.

В отличие от представителей гаммапротеобактерий, имеющих факторы гибернации рибосом RMF, HPF и RaiA, большая часть бактерий, относящихся к данной категории, а также пластыди растений содержат единственный фактор гибернации рибосом – IHPF (long HPF). Последний представляет собой гомолог фактора HPF, который, в отличие от него, имеет удлиненный С-терминальный домен, что дает IHPF возможность формировать неактивные 70S и 100S рибосомы. При этом комплекс IHPF-70S является не только интермедиатом 100S димера, но и представляет собой зрелую неактивную форму, дополняющую пул неактивных рибосом, подобно комплексу RaiA-70S [65, 77, 82].

Наряду с этим, среди бактерий и эукариот распространены альтернативные способы инактивации рибосом, в том числе действующие при участии RsfS (Ribosome silencing factor S), еще одного из представителей факторов гибернации рибосом [83]. RsfS препятствует окончательной сборке рибосомы посредством связывания с 50S субъединицей через L14 рибосомальный белок (рис. 3). Данный механизм гибернации, наряду с другими, обеспечивает мобильную перестройку клеточного метаболизма, обратимую при возникновении

благоприятных условий, когда комплекс RsfS с 50S субъединицей диссоциирует, а малые и большие субъединицы участвуют в сборке функциональных рибосом [83, 84].

Среди описанных факторов гибернации рибосом представляет также интерес YqjD, который посредством своего N-терминального домена связывается с 30S субъединицей в составе 70S или 100S рибосомальных комплексов. В то же время C-терминальный домен YqjD, содержащий трансмембранный мотив, участвует в интеграции рибосомальных комплексов во внутренней мембране грам-отрицательных бактерий и, таким образом, выводит их из клеточного метаболизма [85].

Фактор гибернации рибосом EttA (Energy-dependent translational throttle A) является АТФ-связывающим белком семейства ABC-F [86] (рис. 3). Его взаимодействие с рибосомой происходит в E-сайте, что вызывает ингибирование трансляции в промежутке между формированием первой пептидной связи и первой транслокацией, индуцируемой фактором элонгации EF-G. Диссоциация EttA происходит за счет гидролиза АТФ [87, 88]. Таким образом, особенностью действия EttA является то, что он способен непосредственно воспринимать уровень АТФ в бактериальной клетке и ингибировать трансляцию в ответ на его снижение.

SRA (Stationary-phase-induced ribosome-associated) – небольшой белок 5 kDa, обнаруженный у энтеробактерий. Известно, что SRA связывается с 30S субъединицей рибосомы в стационарной фазе [89].  $\sigma^S$ -зависимая транскрипция *sra* в условиях стресса положительно регулируется сигнальной молекулой (p)ppGpp, а также гистонподобными белками H-NS и FIS [89]. Поскольку SRA мало изучен, его роль до сих пор остается до конца не известной. Однако, основываясь на относительно малочисленных экспериментальных данных, можно предположить, что SRA имеет функцию, сходную с таковой для факторов гибернации рибосом (рис. 3).

Механизмы диссоциации факторов гибернации рибосом и снятия их ингибирующего действия мало исследованы. Известно лишь, что диссоциация 100S димеров у *E. coli* и *Staphylococcus aureus* осуществляется высоко консервативным белком, ГТФазой HflX, преимущественно при повышенной температуре. При нормальных же условиях культивирования более значительную роль в диссоциации 100S димеров играют трансляционные факторы RRF и EF-G [64, 82, 90].

На основании обобщения представленных в литературе данных о механизмах, регулирующих трансляционную активность рибосом, можно прийти к заключению, что “биологическая целесообразность” регуляторных механизмов в первую очередь обусловлена необходимостью избежать непроизводительных затрат энергии на один из

самых энергоемких процессов – синтез белка – в условиях неблагоприятных воздействий, несовместимых с ростом. В соответствии с этим, каждая из рибосом, присутствующих в бактериальной клетке в данный момент времени, может находиться как в активном, так и неактивном состоянии, благодаря действию различных механизмов гибернации рибосом, формирующих, таким образом, гетерогенный набор их неактивных форм.

Таким образом, гетерогенность рибосомальных структур играет ключевую роль в выживании бактерий в меняющихся условиях окружающей среды. Структурно-функциональное разнообразие рибосом создает для бактериальных клеток ряд преимуществ:

1. Гетерогенность – это страхующий механизм. В случае, если по какой-либо причине не работает один из механизмов гибернации рибосом, его функции выполнит другой механизм.

2. Различные виды неактивных рибосом имеют разное соотношение скоростей ассоциации-диссоциации с факторами гибернации, что позволяет предположить возможность разграничения действия разных факторов гибернации во времени.

3. Функциональная дифференциация различных факторов гибернации рибосом отражается на эффективности их участия в противостоянии стрессам разной природы.

**Физиологическая роль факторов гибернации рибосом.** Экспрессия факторов гибернации рибосом находится под контролем механизмов общего стрессорного ответа, включая *rpoS* регулон и стринджен-ответ (рис. 1). Эти механизмы универсальны и несут генерализованный характер, то есть функционируют при различных стрессах, и их действие охватывает значительную часть клеточных процессов. Итогом является изменение экспрессионного профиля клетки [91], в том числе за счет индукции факторов гибернации рибосом, экспрессия которых находится на базовом уровне в экспоненциальной фазе, но возрастает при переходе в стационарную фазу [74, 83, 87, 92].

Известно, что транскрипция генов *rmf*, *hpf* и *raiA* индуцируется сигналом стринджен-ответа, (p)ppGpp, и не зависит от RpoS [2, 93]. В то же время экспрессия *yqjD* находится под строгим контролем RpoS [21, 85]. *rpoS*-регулон представляет собой совокупность генов, промоторы которых имеют сродство к  $\sigma^S$ -субъединице РНК-полимеразы. Продукты этих генов выполняют разнообразные функции в стационарной фазе, а также при адаптации к различным стрессам [94, 95]. Зависимость экспрессии факторов гибернации рибосом от разных стрессорных механизмов может быть связана с разделением функций между ними. Наряду с (p)ppGpp, транскрипция *rmf* и *raiA*

зависит также от транскрипционного регулятора cAMP-CRP [96].

В результате регуляции экспрессии на транскрипционном уровне белок RMF присутствует в клетках только в течение стационарной фазы и деградирует в течение 1 мин после переноса клеток в свежую питательную среду.

Результаты исследований показывают, что транскрипция *rmf* индуцируется в ответ на разнообразные стрессы, включая аминокислотное голодание, тепловой и холодовой шок, воздействие этанола и бромистого этидия, осмотический шок, кислотный стресс [65, 97, 98]. Остальные факторы гибернации рибосом менее изучены, известно только, что содержание RaiA в клетке также возрастает в ответ на холодовой шок [80, 92].

Физиологическая роль факторов гибернации рибосом заключается в выживании бактериальной клетки при воздействии неблагоприятных условий. У большинства протеобактерий, в том числе *E. coli*, описаны различные механизмы гибернации, подробно рассмотренные в главе “Механизмы действия факторов гибернации рибосом” (рис. 3). Поскольку основные факторы гибернации (RMF, HPF и RaiA) индуцируются в присутствии (p)ppGpp и cAMP, их содержание в клетке возрастает в стационарной фазе и состоянии глюкозного голодания (рис. 4) [74, 99]. В то же время, определенный уровень RaiA регистрируется также в экспоненциальной фазе [75]. Это может играть существенную роль в тонкой настройке процесса рибосомальной гибернации посредством конкуренции белковых факторов за связывание с рибосомами. При этом обеспечивается максимальное предохранение рРНК от расщепления и быстрый возврат рибосом в активное состояние после снятия голодания и стресса.

Сходную роль играет также другой рибосом-связывающий белок SRA (рис. 3), взаимодействующий с рибосомами при лимитировании питательных компонентов и переходе клеток в стационарную фазу. SRA рассматривается как дополнительный рибосомальный белок S22 30S субъединицы, который функционирует как фактор гибернации рибосом совместно с другим рибосом-связывающим белком RimJ, играющим роль в созревании 30S субъединицы [100]. Взаимодействие всех рибосомальных белков с рРНК приводит к полной сборке и созреванию рибосом. Кроме того, совместные функции белков S22 и RimJ приводят к снижению синтеза DnaA и, таким образом, участвуют в тонкой настройке инициации репликации. Таким образом, данные факторы участвуют в синхронизации процессов транскрипции, трансляции и репликации в условиях стрессорных ситуаций.

Наиболее полная картина, дающая представление о физиологической роли факторов гибернации, получена с использованием делеционных

мутантов по генам рибосомальной гибернации. В частности, показано, что у мутантов  $\Delta rmf$  снижена выживаемость в стационарной фазе [72, 79] и наблюдается более высокая чувствительность к тепловому [101] и осмотическому шоку [102], а также кислотному стрессу [97]. Мутанты  $\Delta rsfS$  проявляют сниженную выживаемость при переносе клеток в бедную питательную среду и демонстрируют своеобразную динамику роста. После смены питательной среды рост мутанта не отличается от дикого типа, но в середине экспоненциальной фазы наступает внезапная остановка роста, который восстанавливается только по истечении 12 ч дальнейшей инкубации [83]. На питательной среде LB показана пониженная выживаемость мутантов  $\Delta ttaA$  [87].

Кроме того, делеция генов, кодирующих факторы гибернации рибосом, снижает толерантность к аминогликозидным антибиотикам, мишенью которых являются рибосомы. Бактерицидное действие аминогликозидов, как известно, заключается в ингибировании трансляции и образовании аномальных белков, неспособных выполнять свои функции [103]. Мутант  $\Delta hpf$  демонстрирует сниженную толерантность к гентамицину,  $\Delta rmf$  – к гентамицину и нетилмицину [104],  $\Delta yqjD$  – к нетилмицину [21].

В целом, анализируя результаты влияния генных делеций по факторам гибернации рибосом можно прийти к заключению об их вовлеченности в процессы выживания бактерий в условиях воздействия антибиотиков и стрессов.

**Роль факторов гибернации рибосом в бактериальной персистенции.** В последнее время внимание исследователей к факторам гибернации рибосом возросло в связи с их возможным участием в формировании персистенции. Условия среды обитания бактериальных популяций, как известно, переменчивы по ряду факторов, определяющих скорость роста и характер метаболизма. Неоптимальные значения любого фактора среды могут приводить к замедлению или полной остановке роста, поэтому нормальными для микроорганизмов в их естественном местообитании являются переходные состояния между ростом и его отсутствием. Одним из состояний, которые характеризуются торможением пролиферативных и метаболических процессов, является персистенция.

Наиболее полно бактериальная персистенция изучена в отношении действия антибиотиков. Известно, что персисторы – это малочисленная субпопуляция клеток, часто составляющая около 1% от общего их числа в популяции, которые находятся в дормантном состоянии и, благодаря этому, не имеют мишеней для воздействия антибиотиков, нарушающих ростовые процессы. Поэтому персисторы часто, хотя и не всегда, обладают

множественной толерантностью к антибиотикам. После снятия воздействия антибактериального препарата персистерные клетки способны возобновить рост. В связи с этим персистенция представляет собой основную причину рецидивов инфекционных заболеваний [17, 27, 105–107]. Фенотипическая гетерогенность, лабильность, стохастический и индуцибельный характер формирования, полигенная природа, а также низкий уровень содержания персистеров в популяции делают их трудно исследуемым объектом [107–109].

Показано, что ключевую роль в персистенции играет (p)ppGpp – сигнальная молекула стринджент-ответа [46, 110]. Несмотря на то, что участие (p)ppGpp в персистенции не подвергается сомнению, окончательные механизмы его действия до сих пор не установлены. Ранее считалось, что алармон действует через токсин-анти-токсिनные системы. Однако эта модель не приобрела достаточной доказательной базы [111].

На современном этапе одной из признанных моделей формирования персистенции является (p)ppGpp индукция персистообразования, опосредованная факторами гибернации рибосом (рис. 4) [63]. Данная модель, которую авторы обозначили аббревиатурой PRDP (ppGpp ribosome dimerization persister), основана на том, что ppGpp генерирует персистерные клетки путем индукции уровня экспрессии генов, кодирующих факторы гибернации рибосом (RMF, HPF, RaiA), связывание которых с 70S рибосомами (RaiA) или участие в образовании 100S димерных рибосомальных комплексов (RMF, HPF) приводит к инактивации функции рибосом. Эта гипотеза нашла экспериментальное подтверждение в том, что делеционные мутанты по генам гибернации рибосом демонстрируют существенное снижение частоты персистенции при воздействии ампициллина и ципрофлоксацина, наиболее выраженные в отношении  $\Delta rmf$  мутанта [63].

Наряду с (p)ppGpp, цАМФ также индуцирует факторы гибернации RaiA, RMF, HPF в условиях стресса (рис. 4). При этом данные сигнальные молекулы ингибируют фактор HflX, ответственный за диссоциацию димеров рибосом. Это, в свою очередь, приводит к образованию неактивных форм рибосом и индукции персистенции. Возобновление поступления питательных веществ (глюкоза) сопровождается дефосфорилированием ЕПА белка ФТС системы, что вызывает падение активности аденилатциклазы и, соответственно, содержания цАМФ в клетках (рис. 4). Это, в свою очередь, активирует ГТФазу HflX, расщепляющую 100S димеры на функциональные 70S рибосомы. Поэтому делеция гена, кодирующего ГТФазу HflX, блокирует разделение рибосомальных димеров и реактивацию рибосом, что делает невозможным возврат персистеров в вегетативное состояние и,

таким образом, является еще одним прямым доказательством состоятельности представленной гипотезы [63].

**Роль метаболических факторов в регуляции синтеза белков гибернации *E. coli*. Функции полиаминов в тонкой настройке экспрессии генов гибернации.** Полиамины – продукты метаболизма аминокислот орнитина, аргинина, метионина – несмотря на сравнительную простоту химической структуры, характеризуются многообразием функциональных активностей и вовлечены в разнообразные процессы, связанные с ростом и регуляцией генной экспрессии. В клетках бактерий, в частности *E. coli*, они представлены главным образом путресцином ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ), спермидином ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ ) и кадаверином ( $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) [112].

Ранние работы, посвященные выяснению регуляторных функций полиаминов, проведенные с использованием *in vitro* систем белкового синтеза, показали, что полиамины в 1.5–2 раза стимулируют его скорость и повышают точность трансляции опосредованно через положительный эффект на сборку рибосом [113, 114]. Полиамины дифференцированно повышают синтез некоторых рибосомальных белков, среди которых белки S20 и L34 наиболее подвержены их воздействию на уровне транскрипции, участвуя в связывании рибосомальных субъединиц и 16S рРНК. Синтез же большинства рибосомальных белков сбалансирован и координированно регулируется в зависимости от скорости роста бактерий [115]. При этом сборка 30S субъединицы рибосомы положительно модулируется полиаминами посредством стимуляции ферментативного метилирования двух соседних остатков аденина, располагающихся на 3' конце 16S рРНК [116]. Кроме того, как уже сказано выше, стимулирующий эффект полиаминов осуществляется на уровне синтеза полипептидов на матрице мРНК, при этом действие спермидина усиливается в условиях возрастания содержания урациловых нуклеотидов в составе мРНК [117].

Участие полиаминов в фосфолипидном обмене способствует стабилизации мембранной организации при повреждающих условиях среды, что показано на примере воздействия на клетки *E. coli* процедуры замораживания-оттаивания [118]. Описано большое число примеров стабилизирующих эффектов полиаминов на различные клеточные компоненты *in vitro* [119]. Ускоренный рост требует пропорционального возрастания синтеза фосфолипидов как основных мембранных компонентов [120] и происходит за счет усиления их синтеза и снижения скорости катаболизма [121].

Таким образом, ранние работы, описывающие эффекты полиаминов, касались главным образом активно пролиферирующих клеток и связаны с

ускорением синтеза белка, а также положительным эффектом на системы фосфолипидного обмена.

Последующие направления исследования функциональных активностей полиаминов получили свое развитие в связи с тем, что в клетках эти соединения присутствуют главным образом в виде комплексов с РНК, в том числе мРНК. Это послужило основанием для отнесения генов, экспрессия которых регулируется при участии полиаминов, в группу, обозначенную как “полиаминовый модулон” [122]. Данная функция полиаминов сохраняется даже в условиях остановки роста, вызванной исчерпанием источников питания или воздействия неблагоприятных факторов, включая антибиотики. При этом снижается не только эффективность генной экспрессии до 10% от уровня экспоненциального роста, но изменяется также генно-экспрессионный профиль бактерий [44, 45]. Благодаря этому, полиамины способны оказывать стимулирующий эффект на процесс трансляции белков, не только вовлеченных в пролиферацию, но и повышающих выживаемость бактериальных клеток в ответ на стрессорные воздействия [21, 123–125]. В настоящее время описано три различных типа механизмов положительной модуляции генной экспрессии полиаминами, действующими на уровне трансляции посредством взаимодействия с мРНК [122] (рис. 5). Механизм первого типа функционирует в мРНК с необычно большим расстоянием (12 нуклеотидов вместо обычных 7) между стартовым кодоном и последовательностью Шайна-Дальгарно (SD), ответственной за связывание мРНК с рибосомой. В присутствии полиаминов (1 мМ спермидина) это расстояние сокращается за счет образования вторичной структуры мРНК в данной области, что приводит к сильной стимуляции процесса инициации трансляции. Такой механизм действует для мРНК *oppA*, *fecI* ( $\sigma^{18}$ ), *fis*, *rpoN* ( $\sigma^{54}$ ), *hns*, *rpoE* ( $\sigma^{24}$ ) *stpA*, *emrR*, *rmf*, *rpoZ* ( $\omega$ ), *cpxR* и *soxR* [117].

Примером второго типа регуляции является положительный эффект полиаминов на трансляцию мРНК, где вместо AUG присутствует неэффективный кодон инициации, осуществляющий UUG- или GUG-зависимое связывание формилметионил-тРНК (fMet-tRNA) с *cytA*, *cra*, *spoT*, *uvrY*, *frr* (RRF) или *gshA* в комплексе мРНК-рибосома (рис. 5).

Третий тип положительной модуляции генной экспрессии характеризуется воздействием полиаминов на процесс терминации трансляции, что сопровождается ускоренным освобождением завершенных белковых молекул или стимулирует +1 сдвиг рамки считывания на 26-м UGA кодоне мРНК *prfB*, кодирующем RF2 фактор (рис. 5). Этот механизм действует в отношении синтеза  $\sigma^{38}$  (RpoS), одной из альтернативных  $\sigma$ -субъединиц

РНК-полимеразы, ответственной за транскрипцию генов, чьи продукты обуславливают адаптацию *E. coli* к переходу в стационарную фазу роста, голоданию, окислительному стрессу и другим факторам среды, характерным для стационарной фазы [126–128].

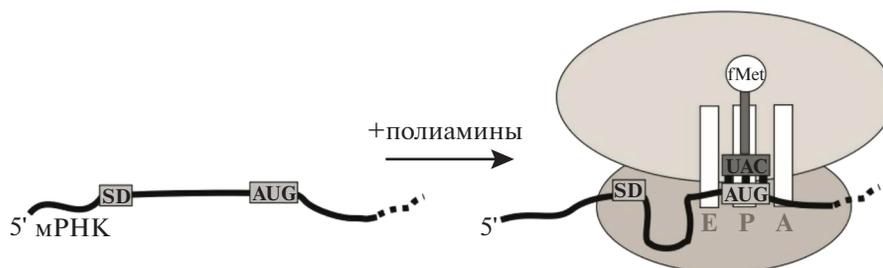
Стимулирующий эффект полиаминов на трансляцию данной субъединицы проявлялся только в отношении тех штаммов *E. coli*, у которых мРНК RpoS содержит необычный 33 кодон в области терминатора (UAG вместо обычного CAG) [78, 129]. Полиамины стимулируют считывание данного амбер-кодона терминации как за счет повышения уровня супрессорной тРНК, так и увеличения аффинности связывания Gln-tRNA<sup>supE</sup> с рибосомами. Мутация в данном положении часто встречается в природных штаммах *E. coli*, чем обусловлена избирательность эффекта полиаминов. Их стимулирующее воздействие не проявляется в отношении других кодонов терминации (UGA, UAA), частота встречаемости которых в различных штаммах составляет 29.3 и 63.1% соответственно [130]. Вследствие того, что UAG используется в качестве кодона терминации в сравнительно небольшом числе генов, происходит избирательная стимуляция полиаминами трансляции мРНК RpoS, не затрагивающая экспрессию основной части генов (рис. 5).

Известно, что полиамины функционируют во многих клеточных процессах, в том числе в адаптации к стрессу [27, 131, 132]. Исходя из этого, логично выглядит возможность их вовлеченности в регуляцию персистенции через положительный эффект на экспрессию *rpoS* [66]. В то же время, до сих пор мало изученными остаются возможные функции полиаминов и других метаболических факторов в регуляции процессов гибернации, принимающих участие в формировании бактериальной персистенции. Исследование влияния генов гибернации рибосом *rmf* и *yqjD* на формирование персистеров, толерантных к нетилмицину, показало, что делеционные мутанты по данным генам имеют значительно более низкую частоту персистенции по сравнению с родительским штаммом. При этом наиболее существенный вклад в формирование персистеров вносит *rmf*, экспрессия которого стимулируется полиаминами в соответствии с концентрационной зависимостью [21, 133]. Сходная картина имеет место в медленно растущих клетках [73, 89]. Максимальная стимуляция *rmf* в контрольном родительском штамме совпадает по времени с наиболее значительным негативным эффектом делеционной мутации на уровень персистенции мутанта  $\Delta rmf$ . Это свидетельствует об опосредованном через *rmf* участии полиаминов в формировании персистерных клеток [21].

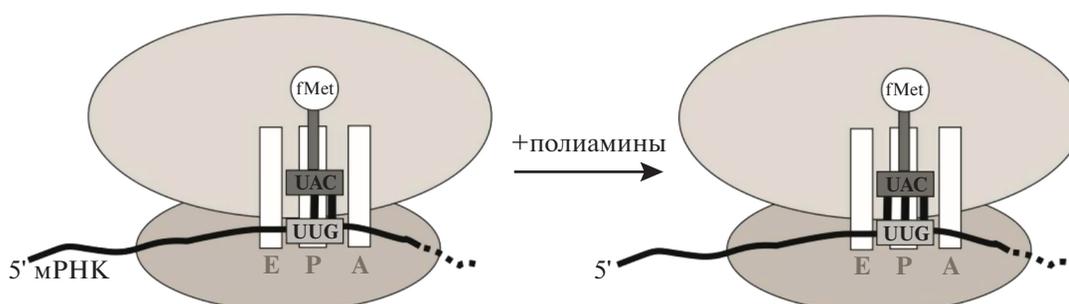
Одним из важных аспектов снижения белок синтезирующей способности бактерий при воз-

Три механизма стимуляции полиаминами  
белкового синтеза

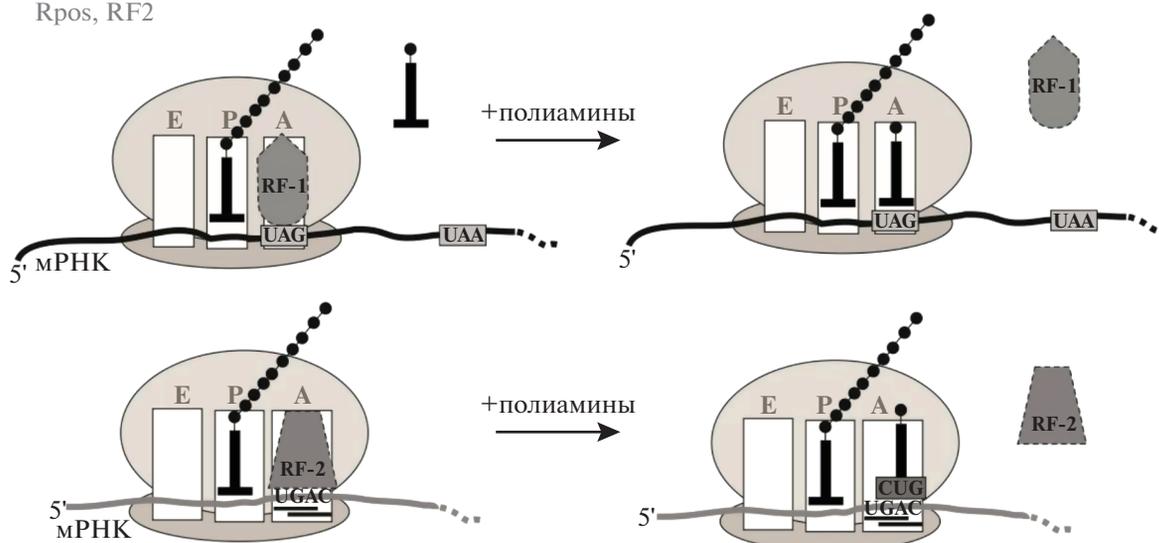
1. Большое расстояние между SD последовательностью и старт-кодоном  
OppA, Fecl, Fis, RpoN, H-NS, StpA, EmrR, RMF, RpoZ, CpxR, SoxR



2. Инициация неэффективного старт-кодона  
Cya, Cra, SpoT, UvrY, RRF, GshA



3. Супрессия и +1-сдвиг рамки считывания в нонсенс-кодоне  
Rpos, RF2



**Рис. 5.** Полиаминовый модулон. Три механизма стимуляции полиаминами белкового синтеза: 1 – преодоление ограничения трансляции генов с необычно длинным участком мРНК между стартовым кодоном и последовательностью Шайна–Дальгарно (SD) посредством образования вторичной структуры в данной области; 2 – увеличение трансляции генов с неэффективными кодонами инициации UUG или GUG; 3 – положительная модуляция генной экспрессии путем воздействия полиаминов на процесс терминации трансляции, сдвиг рамки считывания +1. Пояснения к рисунку приводятся в тексте.

действии стрессов является возрастание активности, приводящей к расщеплению 16S рРНК в 30S субъединицах рибосом [134–136]. Показано, что при переходе в стационарную фазу в клетках *E. coli* происходит фрагментация 16S рРНК, локализованная преимущественно на конце спирали 6 внутри 30S рибосомальной субъединицы [135]. Это сопровождается снижением белоксинтезирующей активности рибосомы [136] и может приводить к задержке ее восстановления после возврата клеток к оптимальным условиям роста, что само по себе является эффективным механизмом гибернации рибосом. Недавно показано, что деградация 16S рРНК обусловлена активностью эндорибонуклеазы YbeY и экзорибонуклеазы RNase R, вводящих разрыв на 3' конце 16S рРНК, локализованном между 30S и 50S субъединицами [5, 136]. В последнее время опубликованы данные, свидетельствующие, что накопление фрагментированных рРНК как в цельных рибосомах, так и в рибосомальных субъединицах значительно возрастает в отсутствие факторов гибернации рибосом [5]. Это указывает на возможность участия последних в защитных механизмах, направленных на поддержание целостности рибосомальной структуры.

В регуляции РНКазной активности принимают участие как факторы гибернации рибосом, так и полиамины, связывание которых с 16S рРНК в определенных локусах приводит к подавлению этой активности [5, 135, 136]. Описанный механизм действует во время формирования клетками ответа на стресс голодания, однако в отсутствие факторов гибернации у делеционных мутантов в местах их потенциального связывания происходит фрагментация 16S рРНК.

Важным фактором в стимуляции сборки 30S субъединицы рибосом *E. coli*, как известно, являются полиамины [137]. Исходя из этого, становится понятной их функция, направленная, наряду с рибосомальными белками и факторами гибернации, на сохранение целостности 16S рРНК и восстановление синтеза белка после снятия стрессов стационарной фазы.

В течение длительного времени накоплен значительный объем данных о полиаминах как факторах, способствующих осуществлению рибосомальных функций. Константы связывания полиаминов с рибосомальными РНК, как опубликовано, составляют  $0.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  для спермина и  $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  для спермидина с числом сайтов от 0,11 аминов на фосфат нуклеиновой кислоты для спермидина и в более широком диапазоне (0.082–0.133) для спермина [138]. Знание особенностей сайтов преимущественного связывания полиаминов с РНК важны для понимания механизмов их участия в структуре специфических функций рибосомальных, транспортных и информационных РНК. В настоящее время известно, что такие сайты представлены

в структуре РНК главным образом остатками аденина и урацила и располагаются в слабо структурированных областях, включая одноцепочечные петли [135].

Одним из основных видов белковых мишеней для вторичного мессенджера (p)ppGpp, ответственного за развитие стринджен-ответа, являются пиридоксальфосфат-зависимые декарбоксилазы алифатических аминокислот, включая индуцибельную лизиндекарбоксилазу (LdcI/CadA), конститутивную лизиндекарбоксилазу (LdcC), индуцибельную аргининдекарбоксилазу (AdiA), индуцибельную орнитиндекарбоксилазу (SpeF) и конститутивную орнитиндекарбоксилазу (SpeC) [48, 139]. Эти мультидоменные ферменты формируют большие олигомерные комплексы, состоящие из димеров (SpeF, SpeC) или декамеров (LdcI, LdcC, AdiA). Индуцибельные ферменты вовлечены в стрессорные ответы (кислотный стресс), тогда как конститутивные, в частности SpeC, выполняют функции синтеза полиаминов.

Показано, что перечисленные ферменты способны с высокой аффинностью связывать (p)ppGpp, что сопровождается ингибированием их активности. Это объясняется необходимостью сохранения ресурсов аминокислот в условиях голодания и стресса. Однако падение внутриклеточного содержания полиаминов становится реальным скорее лишь в поздней стационарной фазе. В то же время, к моменту прекращения роста бактериальных клеток при переходе в стационарную фазу в культуре накапливается достаточно высокая их концентрация. В таких условиях полиамины способны осуществлять свои регуляторные функции применительно к РНК на уровнях транскрипции и трансляции, несмотря на ингибирование орнитиндекарбоксилаз как реакции на стринджен-ответ. В том числе, это, по-видимому, касается способности полиаминов оказывать положительное воздействие на содержание факторов гибернации. Кроме того, в присутствии ГТФ и ГДФ возможна активация ферментов синтеза полиаминов и возрастание содержания их продуктов [48].

Естественные уровни полиаминов в бактериальных клетках могут контролировать структурно-функциональные свойства РНК, связанные с синтезом белка. Кроме того, полиамины способны модулировать множество дополнительных процессов, обеспечивающих функции ДНК, таких как хеликазная активность. Следовательно, изучение процессов взаимодействия полиаминов с нуклеиновыми кислотами *in vivo* или *in vitro* может быть высоко информативным с точки зрения выяснения механизма гибернации рибосом [135].

Таким образом, полиамины обладают способностью осуществлять регуляцию клеточного метаболизма, положительно воздействуя на синтез рибосомальных белков, скорость сборки рибосом,

общую скорость белкового синтеза, целостность 16S рРНК, а также генную экспрессию на уровнях транскрипции, трансляции и терминации. Анализ генов, входящих в группу полиаминового модулона, свидетельствует о том, что на сегодняшний день некоторые из генов гибернации рибосом отнесены к этой группе [117].

*Функции индола в регуляции активности факторов гибернации рибосом и формировании персистерного состояния бактериальных клеток.* Индол представляет собой гетероциклическое ароматическое соединение [140], которое продуцируется более чем 85 видами грам-отрицательных и грам-положительных бактерий, включая их патогенных и непатогенных представителей [141]. В последнее время индол привлекает внимание присутствующими ему свойствами сигнальной молекулы, используемой как средство внутри- и межвидовой коммуникации, причем не только между бактериальными видами, но и в их взаимодействии с клетками организма-хозяина [141–144]. Образование индола зависит исключительно от количества экзогенного триптофана [145]. При этом клетки *E. coli* конвертируют эту аминокислоту в равное количество индола, конечный уровень которого в среде может максимально достигать 5 мМ.

Несмотря на присутствие альтернативных транспортеров (AgoP и Mtr), продукция индола зависит исключительно от белка TnaB, ответственного за транспорт триптофана из среды, который далее расщепляется триптофаназой TnaA до индола и пирувата аммония [146, 147]. Это обеспечивает условие, при котором в отсутствие экзогенного триптофана TnaA не может гидролизовать внутриклеточный анаболический пул этой аминокислоты и, таким образом, влиять на рост бактерий.

В настоящее время описано, по меньшей мере, два типа действия индола: длительный, но низкоуровневый “персистентный сигнал” и короткоживущий высокоуровневый “пульс сигнал” [148, 149]. Первый из них (0.5–1.0 мМ индола) участвует в формировании устойчивости к множественным стрессам, тогда как второй, обусловленный кратковременным возрастанием внутриклеточной концентрации индола до 60 мМ в момент перехода клеток в стационарную фазу, делает вклад в выживание *E. coli* при голодании и участвует в формировании персистерного состояния.

Индол, представляя собой межклеточный сигнал в микробных сообществах [150], оказывает многообразный спектр эффектов на физиологию и метаболизм бактерий, включая образование биопленок [143], антибиотикорезистентность [151], образование персистерных клеток [19], вирулентность [152] и другие. Однако молекулярные мишени и механизмы его действия все еще остаются неясными. В частности, это касается роли индола в формировании персистерного состояния у бак-

терий. Пульс индола в момент перехода бактерий в стационарную фазу рассматривается как механизм, вызывающий прекращение роста для сохранения ресурсов, обеспечивающих выживание в новых условиях [148, 149].

Гены триптофаназы TnaA и транспортного белка TnaB, входящие в *tna* оперон, находятся под контролем сAMP/CRP-зависимого механизма катаболитной репрессии и индуцируются на уровне транскрипции при исчерпании углеводов и переходе клеток в стационарную фазу [153]. Это приводит к накоплению индола в клетках за счет различий в скоростях его синтеза и выхода в среду. При этом ионофорные свойства индола, как считают, могут быть ответственны за рассеивание энергии трансмембранного потенциала протонов и преждевременную остановку роста [149, 154]. В то же время, низкое энергетическое состояние бактерий рассматривается как один из факторов формирования дормантности, способствующий развитию персистенции [155, 156].

Наряду со стринджен-ответом, который приводит к синтезу (p)ppGpp, снятие катаболитной репрессии при переходе в стационарную фазу роста или при воздействии стрессов сопровождается образованием цАМФ. Оба эти вторичных мессенджера совместно индуцируют факторы гибернации рибосом (RMF, HPF, RaiA), которые также отвечают за формирование персистеров (рис. 4) [2, 157].

В то же время, недавно показано, что субингибиторные (суб-МПК) (МПК – минимальная подавляющая концентрация) концентрации антибиотиков, в частности, аминогликозидов, могут выступать в качестве сигналов, повышающих продукцию индола [158]. В свою очередь, исследование отклика со стороны уровня экспрессии различных генов на добавку индола показало сильное возрастание уровня экспрессии фактора гибернации рибосом *raiA*, что сопровождалось 100-кратным увеличением числа персистеров, толерантных к аминогликозидам [158]. В то же время, Заркан с соавт. [159] показали участие индола в формировании специфических персистеров, толерантных к фторхинолонам, посредством взаимодействия с АТФ-связывающим сайтом ДНК-гиразы, мишени антибиотиков данного класса. Несмотря на это, на основе широкого анализа данных большинство авторов склонно считать, что в развитии персистерного состояния преобладающими являются генерализованные эффекты индола на метаболизм, приводящие к замедлению его скорости и формированию неспецифической толерантности к антибиотикам и стрессам [148]. К подобным воздействиям можно отнести такие, как: деэнергизация клеток и стимуляция экспрессии факторов гибернации рибосом.

Роль индола в формировании персистерного состояния недавно подтверждена на его естественных производных, индолокинах, представляющих собой нормальные продукты метаболизма бактерий [160]. Этот класс соединений в большом разнообразии представлен в различных видах бактерий, входящих в консорциум микрофлоры кишечника человека, прежде всего, в *E. coli*. Причем индолокины, как показано авторами, обладают свойствами межвидовых сигналов между бактериями, с одной стороны, и человеком и растениями – с другой [160]. В последнем случае они способны повышать врожденные иммунные ответы человека и растений.

Синтез индолокинов, в отличие от индола, катализируется не триптофаназой TnaA, а аминоксидотрансферазой аминокислот AspC путем переноса аминоксидной группы от ароматических аминокислот, включая триптофан, на 2-кетоглутарат как преобладающий косубстрат [161], чем обусловлено большее разнообразие индолокинов. Содержание этих соединений возрастало в ответ на сублетальные воздействия антибиотиков, окислительного стресса и при переходе клеток в стационарную фазу, что сопровождалось формированием персистеров. В этот период активировалась функция факторов гибернации рибосом, положительно регулируемых индолами на транскрипционном уровне [2, 158].

Наряду с нормальными продуктами метаболизма, индолокинами, синтезированы и исследованы также разнообразные индольные производные (индигоиды) [157], функции которых авторы связывают с их способностью повреждать мембраны и вызывать прямо противоположный эффект, т.е. гибель персистерных клеток. Возможно, что противоположные эффекты (индукция персистенции [19, 160] либо киллерные функции в отношении персистеров [157]), описанные разными авторами для близких по структуре индольных соединений объясняются существованием тонкой грани между нарушением энергетической функции мембран и их необратимым изменением. При этом необходимо учитывать также различия между глубиной дормантного состояния, формируемого под воздействием различных индольных производных, от которой зависит уровень персистенции. Высшей степенью проявления глубины дормантности является формирование VBNC клеток, возрастание содержания которых в популяции может создавать иллюзию гибели персистеров, поскольку восстановление роста VBNC клеток характеризуется значительно более длительным лаг-периодом ( $T_{\text{regrowth}}$ ) [30].

Получение эффективных средств на базе индольных производных, усиливающих действие антибиотиков, делает необходимым их углубленное изучение, в том числе применительно к дей-

ствию на факторы гибернации рибосом и персистообразование.

\*\*\*

Бактерии демонстрируют способность выживания в самых разнообразных условиях среды. Это обусловлено высокой мобильностью их метаболизма, которая достигается за счет согласованного действия регуляторных механизмов, участвующих в формировании адаптивных ответов на стресс. При неблагоприятных условиях среды механизмы общего стрессорного ответа (стринджен-ответ, *proS*-регулон, полиаминовый модулон) индуцируют факторы гибернации рибосом, которые переводят рибосомы в неактивное состояние. К факторам гибернации относятся рибосом-связывающие белки, инактивирующие 70S рибосомы (RaiA), формирующие неактивные 100S димеры (RMF, HPF) или действующие на других стадиях трансляционного цикла (RsfS, YqjD, SRA, EttA). Прекращение биосинтеза белков под действием факторов гибернации вызывает замедление клеточного метаболизма вплоть до полной остановки роста и деления. Это способствует формированию в бактериальной популяции дормантных клеток, обладающих свойствами фенотипической толерантности ко многим антибиотикам и стрессам и способных к персистенции. Механизм перехода бактерий в дормантное состояние связывают с их способностью образовывать внутриклеточные структуры, “агресомы”, которые представляют собой малоактивные высокомолекулярные белковые агрегаты, состоящие из ферментов, участвующих в формировании основных метаболических путей. Обсуждается концепция глубины дормантности, согласно которой персистерное состояние соответствует относительно более низким уровням ее глубины, тогда как состояние некультивируемости (VBNC) имеет максимальное значение глубины дормантности. В регуляции активности факторов гибернации рибосом принимают участие продукты метаболизма бактерий, включая полиамины и индолы. Обсуждаются механизмы воздействия этих соединений на функции факторов гибернации рибосом в процессе формирования персистерного состояния. При переносе дормантных клеток в оптимальные условия происходит освобождение рибосом от факторов гибернации, что приводит к восстановлению нормального роста исходных клеток. В случае патогенных видов бактерий это вызывает рецидивирующее течение инфекционного процесса. Поэтому исследование функции факторов гибернации рибосом становится крайне важным для практической медицины.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда № 18-73-10156.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sachidanandham R., Yew-Hoong Gin K.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 81. № 5. P. 927–941.
2. *Prossliner T., Winther K.S., Sorensen M.A., Gerdes K.* // Annu. Rev. Genet. 2018. V. 52. № 1. P. 321–348.
3. *Gray J.V., Petsko G.A., Johnston G.C., Ringe D., Singer R.A., Werner-Washburne M.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 2. P. 187–206.
4. *Kolter R., Siegele D.A., Tormo A.* // Annu. Rev. Microbiol. 1993. V. 47. P. 855–874.
5. *Prossliner T., Gerdes K., Sorensen M.A., Winther K.S.* // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. № 4. P. 2226–2239.
6. *Bigger J.* Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by Intermittent Sterilisation. 1944. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
7. *Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan B.E., Singh P.K.* // Science. 2011. V. 334. № 6058. P. 982–986.
8. *Orman M.A., Brynildsen M.P.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. № 7. P. 3230–3239.
9. *Wood T.K., Knabel S.J., Kwan B.W.* // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 23. P. 7116–7121.
10. *Wood T.K., Song S.* // Biofilm. 2020. V. 2. P. 100018. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100018>
11. *Choi P.J., Cai L., Frieda K., Xie X.S.* // Science. 2008. V. 322. № 5900. P. 442–446.
12. *Dubnau D., Losick R.* // Mol. Microbiol. 2006. V. 61. № 3. P. 564–572.
13. *Buerger S., Spoering A., Gavrish E., Leslin C., Ling L., Epstein S.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 9. P. 3221–3228.
14. *Kotte O., Volkmer B., Radzikowski J.L., Heinemann M.* // Mol. Syst. Biol. 2014. V. 10. № 7. P. 736. <https://doi.org/10.15252/msb.20135022>
15. *Kussell E., Leibler S.* // Science. 2005. V. 309. № 5743. P. 2075–2078.
16. *Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S.* // Science. 2004. V. 305. № 5690. P. 1622–1625.
17. *Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.L., et al.* // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. № 7. P. 441–448.
18. *Levin-Reisman I., Balaban N.* Quantitative Measurements of Type I and Type II Persisters Using ScanLag. Bacterial Persistence. /Eds. J. Michiels, M. Fauvert. N.Y.: Springer, 2016. P. 75–81.
19. *Vega N.M., Allison K.R., Khalil A.S., Collins J.J.* // Nat. Chem. Biol. 2012. V. 8. № 5. P. 431–433.
20. *Battesti A., Majdalani N., Gottesman S.* // Proc. Natl Acad. Sci USA. 2015. V. 112. № 16. P. 5159–5164.
21. *Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S.* // FEMS Microbiol Lett. 2017. V. 364. № 9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx084>
22. *Pacios O., Blasco L., Bleriot I., Fernandez-Garcia L., Ambroa A., López M., et al.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2020. V. 64. № 10. P. e01283–20.
23. *Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Sidorov R.Y., Nesterova L.Y., Akhova A.V., Tsyganov I.V. et al.* // Cell Chem. Biol. 2021. V. 28. № 10. P. 1420–1432.e9.
24. *Paul P., Sahu B.R., Suar M.* // Mol. Oral Microbiol. 2019. V. 34. № 3. P. 97–107.
25. *Fridman O., Goldberg A., Ronin I., Shores N., Balaban N.Q.* // Nature. 2014. V. 513. № 7518. P. 418–421.
26. *Pu Y., Zhao Z., Li Y., Zou J., Ma Q., Zhao Y., et al.* // Mol. Cell. 2016. V. 62. № 2. P. 284–294.
27. *Ткаченко А.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 110–133.
28. *Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K.* // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 24. P. 8172–8180.
29. *Dewachter L., Bollen C., Wilmaerts D., Louwagie E., Herpels P., Matthay P., et al.* // mBio. 2021. V. 12. № 4. P. e0070321. <https://doi.org/10.1128/mBio.00703-21>
30. *Pu Y., Li Y., Jin X., Tian T., Ma Q., Zhao Z., Lin S.Y., Chen Z., Li B., Yao G., Leake M.C., Lo C.J., Bai F.* // Mol. Cell. 2019. V. 73. № 1. P. 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.022>
31. *Shleeva M., Mukamolova G.V., Young M., Williams H.D., Kaprelyants A.S.* // Microbiology. 2004. V. 150. № 6. P. 1687–1697.
32. *Su X., Chen X., Hu J., Shen C., Ding L.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. № 12. P. 2213–2218.
33. *Nystrom T.* // Bioessays. 2003. V. 25. № 3. P. 204–211.
34. *Desnues B., Cuny C., Gregori G., Dukan S., Aguilaniu H., Nystrom T.* // EMBO Rep. 2003. V. 4. № 4. P. 400–404.
35. *Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., El-Registan G.I., Sokolova O.S., Krupyanskii Y.F.* // PLoS One. 2020. V. 15. № 10. e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
36. *Seyffer F., Kummer E., Oguchi Y., Winkler J., Kumar M., Zahn R., Sourjik V., Bukau B., Mogk A.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2012. V. 19. № 12. P. 1347–1355.
37. *Patel A., Malinowska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman A.A.* // Science. 2017. V. 356. № 6339. P. 753–756.
38. *Parry B.R., Surovtsev I.V., Cabeen M.T., O'Hern C.S., Dufresne E.R., Jacobs-Wagner C.* // Cell. 2014. V. 156. № 1. P. 183–194.
39. *Maisonneuve E., Gerdes K.* // Cell. 2014. V. 157. № 3. P. 539–548.
40. *Baym M., Lieberman T.D., Kelsic E.D., Chait R., Gross R., Yelin I., Kishony R.* // Science. 2016. V. 353. № 6304. P. 1147–1151.
41. *Lee H.H., Molla M.N., Cantor C.R., Collins J.J.* // Nature. 2010. V. 467. № 7311. P. 82–85.
42. *Cohen N.R., Lobritz M.A., Collins J.J.* // Cell Host Microbe. 2013. V. 13. № 6. P. 632–642.
43. *Yoshida H., Wada A., Shimada T., Maki Y., Ishihama A.* // Front. Genet. 2019. V. 10. P. 1153. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01153>
44. *Hengge-Aronis R.* // Curr. Opin. Microbiol. 2002. V. 5. № 6. P. 591–595.
45. *Ishihama A.* // Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. 2012. V. 88. № 9. P. 485–508.

46. Haurlyuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 5. P. 298–309.
47. Liu K., Bittner A.N., Wang J.D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2015. V. 24. P. 72–79.
48. Kanjee U., Ogata K., Houry W.A. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 85. № 6. P. 1029–1043.
49. Bremer H., Dennis P. // *Biochimie.* 2008. V. 90. № 3. P. 493–499.
50. Srivatsan A., Wang J.D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. V. 11. № 2. P. 100–105.
51. Lee J.W., Park Y.H., Seok Y.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 29. P. E6845–E6854.
52. Fernández-Coll L., Cashel M. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 592718.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.592718>
53. Battesti A., Bouveret E. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 62. № 4. P. 1048–1063.
54. Wang B., Dai P., Ding D., Del Rosario A., Grant R.A., Penielute B.L., Laub M.T. // *Nat. Chem. Biol.* 2019. V. 15. № 2. P. 141–150.
55. Magnusson L.U., Farewell A., Nystrom T. // *Trends Microbiol.* 2005. V. 13. № 5. P. 236–242.
56. Potrykus K., Cashel M. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2008. V. 62. № 1. P. 35–51.
57. Paul B.J., Ross W., Gaal T., Gourse R.L. // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 749–770.
58. Jishage M., Ishihama A. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 23. P. 6832–6835.
59. Park Y.H., Lee C.R., Choe M., Seok Y.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 52. P. 21142–21147.
60. Rodionova I.A., Zhang Z., Mehla J., Goodacre N., Babu M., Emili A., Uetz P., Saier M.H.Jr. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 34. P. 14250–14257.
61. Fernandez-Coll L., Maciag-Dorszynska M., Taylor K., Vadia S., Levin P.A., Szalewska-Palasz A., Cashel M. // *mBio.* 2020. V. 11. № 2. e03223-19.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.03223-19>
62. Zhu M., Dai X. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № 9. P. 4684–4693.
63. Song S., Wood T.K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 523. № 2. P. 281–286.
64. Gohara D.W., Yap M.F. // *Curr. Genet.* 2018. V. 64. № 4. P. 753–760.
65. Yoshida H., Wada A. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2014. V. 5. № 5. P. 723–732.
66. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Karavaeva E.A., Shumkov M.S. // *FEMS Microbiol Lett.* 2014. V. 361. № 1. P. 25–33.
67. Marshall R.A., Aitken C.E., Dorywalska M., Puglisi J.D. // *Annu. Rev. Biochem.* 2008. V. 77. № 1. P. 177–203.
68. Trosch R., Willmund F. // *Biol. Chem.* 2019. V. 400. № 7. P. 879–893.
69. Polikanov Y.S., Blaha G.M., Steitz T.A. // *Science.* 2012. V. 336. № 6083. P. 915–918.
70. Shcherbakova K., Nakayama H., Shimamoto N. // *Genes Cells.* 2015. V. 20. № 10. P. 789–801.
71. Ueta M., Yoshida H., Wada C., Baba T., Mori H., Wada A. // *Genes Cells.* 2005. V. 10. № 12. P. 1103–1112.
72. Wada Y., Sambongi Y., Futai M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1459. № 2–3. P. 499–505.
73. Wada A., Yamazaki Y., Fujita N., Ishihama A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 7. P. 2657–2661.
74. Aiso T., Yoshida H., Wada A., Ohki R. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 6. P. 1951–1958.
75. Wada A. // *Genes Cells.* 1998. V. 3. № 4. P. 203–208.
76. Maki Y., Yoshida H., Wada A. // *Genes Cells.* 2000. V. 5. № 12. P. 965–974.
77. Ueta M., Ohniwa R.L., Yoshida H., Maki Y., Wada C., Wada A. // *J. Biochem.* 2008. V. 143. № 3. P. 425–433.
78. Yoshida M., Kashiwagi K., Kawai G., Ishihama A., Igarashi K. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 40. P. 37139–37146.
79. Yamagishi M., Matsushima H., Wada A., Sakagami M., Fujita N., Ishihama A. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 2. P. 625–630.
80. Vila-Sanjurjo A., Schuwirth B.S., Hau C.W., Cate J.H. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. V. 11. № 11. P. 1054–1059.
81. Agafonov D.E., Kolb V.A., Nazimov I.V., Spirin A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 22. P. 12345–12349.
82. Basu A., Shields K.E., Eickhoff C.S., Hoft D.F., Yap M.-N.F. // *J. Bacteriol.* 2018. V. 200. № 24. e00426-18.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00426-18>
83. Hauser R., Pech M., Kijek J., Yamamoto H., Titz B., Naeve F., et al. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 7. e1002815.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002815>
84. Li X., Sun Q., Jiang C., Yang K., Hung L.W., Zhang J., Sacchettini J.C. // *Structure.* 2015. V. 23. № 10. P. 1858–1865.
85. Yoshida H., Maki Y., Furuike S., Sakai A., Ueta M., Wada A. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. № 16. P. 4178–4183.
86. Murina V., Kasari M., Takada H., Hinno M., Saha C.K., Grimshaw J.W. et al. // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. № 18. P. 3568–3590.
87. Boel G., Smith P.C., Ning W., Englander M.T., Chen B., Hashem Y. et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. № 2. P. 143–151.
88. Chen B., Boel G., Hashem Y., Ning W., Fei J., Wang C., Gonzalez R.L.Jr., Hunt J.F., Frank J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. № 2. P. 152–159.
89. Izutsu K., Wada A., Wada C. // *Genes Cells.* 2001. V. 6. № 8. P. 665–676.
90. Zhang Y., Mandava C.S., Cao W., Li X., Zhang D., Li N., Zhang Y., Zhang X., Qin Y., Mi K., Lei J., Sanyal S., Gao N. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. V. 22. № 11. P. 906–913.
91. Ткаченко А. Молекулярные механизмы стрессорных ответов у микроорганизмов. / Ред. В.А. Демаков. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2012. 237 с.
92. Agafonov D.E., Kolb V.A., Spirin A.S. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2001. V. 66. P. 509–514.
93. Izutsu K., Wada C., Komine Y., Sako T., Ueguchi C., Nakura S., Wada A. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 9. P. 2765–2773.

94. *Battesti A., Majdalani N., Gottesman S.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2011. V. 65. P. 189–213.
95. *Hengge-Aronis R.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 4. № 3. P. 341–346.
96. *Shimada T., Yoshida H., Ishihama A.* // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. № 10. P. 2212–2219.
97. *El-Sharoud W.M., Niven G.W.* // *Microbiology.* 2007. V. 153. № 1. P. 247–253.
98. *Moen B., Janbu A.O., Langsrud S., Langsrud O., Kohler A., Rudi K.* // *Can. J. Microbiol.* 2009. V. 55. № 6. P. 714–728.
99. *Shimada T., Makinoshima H., Ogawa Y., Miki T., Maeda M., Ishihama A.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 21. P. 7112–7122.
100. *Zhang S., Wunier W., Yao Y., Morigen M.* // *J. Basic Microbiol.* 2018. V. 58. № 12. P. 1091–1099.
101. *Niven G.W.* // *Arch. Microbiol.* 2004. V. 182. № 1. P. 60–66.
102. *Garay-Arroyo A., Colmenero-Flores J.M., Garciarribio A., Covarrubias A.A.* // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 8. P. 5668–5674.
103. *Serio A.W., Keepers T., Andrews L., Krause K.M.* // *EcoSal Plus.* 2018. V. 8. № 1. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018>
104. *McKay S.L., Portnoy D.A.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 11. P. 6992–6999.
105. *Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. № 3. P. 219–251.
106. *Fisher R.A., Gollan B., Helaine S.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2017. V. 15. № 8. P. 453–464.
107. *Lewis K.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. № 15. P. 357–372.
108. *Dhar N., McKinney J.D.* // *Curr. Opin. Microbiol.* 2007. V. 10. № 1. P. 30–38.
109. *Zhang Y.* // *Emerg. Microbes Infect.* 2014. V. 3. № 1. e3. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.3>
110. *Kushwaha G.S., Oyeyemi B.F., Bhavesh N.S.* // *Biochimie.* 2019. V. 165. P. 67–75.
111. *Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K.* // *Cell.* 2018. V. 172. № 5. P. 1135. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.023>
112. *Tabor H., Tabor C.W.* // *Pharmacol. Rev.* 1964. V. 16. № 3. P. 245–300.
113. *Huang S.C., Panagiotidis C.A., Canellakis E.S.* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 9. P. 3464–3468.
114. *Igarashi K., Hashimoto S., Miyake A., Kashiwagi K., Hirose S.* // *Eur. J. Biochem.* 1982. V. 128. № 2–3. P. 597–604.
115. *Nomura M., Gourse R., Baughman G.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1984. V. 53. № P. 75–117.
116. *Igarashi K., Kishida K., Kashiwagi K., Tatokoro I., Kakegawa T., Hirose S.* // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 113. № 3. P. 587–593.
117. *Igarashi K., Kashiwagi K.* // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 48. P. 18702–18709.
118. *Souzu H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. V. 861. № 2. P. 353–360.
119. *Tabor C.W., Tabor H.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1976. V. 45. № 1. P. 285–306.
120. *Munro G.F., Bell C.A.* // *J. Bacteriol.* 1973. V. 116. № 3. P. 1479–1481.
121. *Peter H.W., Gunther T., Seiler N.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1979. V. 5. № 6. P. 389–393.
122. *Igarashi K., Kashiwagi K.* // *J. Biochem.* 2006. V. 139. № 1. P. 11–16.
123. *Sakamoto A., Terui Y., Yoshida T., Yamamoto T., Suzuki H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., Kashiwagi K.* // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 4. P. e0124883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124883>
124. *Schneider B.L., Hernandez V.J., Reitzer L.* // *Mol. Microbiol.* 2013. V. 88. № 3. P. 537–550.
125. *Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nesterova L.Y.* // *Res. Microbiol.* 2012. V. 163. № 2. P. 83–91.
126. *Jaishankar J., Srivastava P.* // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 2000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>
127. *Klauck E., Typas A., Hengge R.* // *Sci. Prog.* 2007. V. 90. № 2–3. P. 103–127.
128. *Hengge R.* // *Res. Microbiol.* 2009. V. 160. № 9. P. 667–676.
129. *Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H., Ishihama A., Igarashi K.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 44. P. 46008–46013.
130. *Blattner F.R., Plunkett G.III, Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M. et al.* // *Science.* 1997. V. 277. № 5331. P. 1453–1462.
131. *Igarashi K., Kashiwagi K.* // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 42. № 1. P. 39–51.
132. *Tabor C.W., Tabor H.* // *Microbiol. Rev.* 1985. V. 49. № 1. P. 81–99.
133. *Terui Y., Tabei Y., Akiyama M., Higashi K., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K., Kashiwagi K.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 37. P. 28698–28707.
134. *Vourekas A., Stamatopoulou V., Toumpeki C., Tsit-laidou M., Drainas D.* // *IUBMB Life.* 2008. V. 60. № 10. P. 669–683.
135. *Lightfoot H.L., Hall J.* // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 18. P. 11275–11290.
136. *Luidalepp H., Berger S., Joss O., Tenson T., Polacek N.* // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 10. P. 2237–2247.
137. *Igarashi K., Kashiwagi K.* // *IUBMB Life.* 2015. V. 67. № 3. P. 160–169.
138. *Kučan Z., Naranda T., Plohl M., Nöthig-Laslo V., Weygand-Durasević I.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988. V. 250. P. 525–533.
139. *Kanjee U., Gutsche I., Ramachandran S., Houry W.A.* // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 43. P. 9388–9398.
140. *Roychowdhury P., Basak B.S.* // *Acta Crystallogr. B.* 1975. V. 31. № 6. P. 1559–1563.
141. *Lee J.-H., Lee J.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 4. P. 426–444.
142. *Wang D., Ding X., Rather P.* // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 14. P. 4210–4216.
143. *Lee J., Jayaraman A., Wood T.* // *BMC Microbiol.* 2007. V. 7. № 1. P. 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-42>
144. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. V. 31. № 4. P. 425–448.

145. *Li G., Young K.D.* // *Microbiology*. 2013. V. 159. Pt 2. P. 402–410.
146. *Phillips R.S., Demidkina T.V., Faleev N.G.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. V. 1647. № 1–2. P. 167–172.
147. *Newton W.A., Morino Y., Snell E.E.* // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 1211–1218.
148. *Zarkan A., Liu J., Matuszewska M., Gaimster H., Summers D.K.* // *Trends Microbiol.* 2020. V. 28. № 7. P. 566–577.
149. *Gaimster H., Cama J., Hernández-Ainsa S., Keyser U.F., Summers D.K.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4. e93168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093168>
150. *Kim J., Park W.* // *J. Microbiol.* 2015. V. 53. № 7. P. 421–428.
151. *Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A.* // *Mol. Microbiol.* 2005. V. 55. № 4. P. 1113–1126.
152. *Hirakawa H., Kodama T., Takumi-Kobayashi A., Honda T., Yamaguchi A.* // *Microbiology*. 2009. V. 155. № 2. P. 541–550.
153. *Stewart V., Yanofsky C.* // *J. Bacteriol.* 1985. V. 164. № 2. P. 731–740.
154. *Zarkan A., Caño-Muñiz S., Zhu J., Al Nahas K., Cama J., Keyser U.F., Summers D.K.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 3868. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40560-3>
155. *Chimerel C., Field C.M., Pintero-Fernandez S., Keyser U.F., Summers D.K.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. № 7. P. 1590–1594.
156. *Lewis K.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. V. 5. № 1. P. 48–56.
157. *Song S., Wood T.K.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 1565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01565>
158. *Lang M., Krin E., Korlowski C., Sismeiro O., Varet H., Coppée J.-Y., Mazel D., Baharoglu Z.* // *iScience*. 2021. V. 24. № 10. P. 103128. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103128>
159. *Zarkan A., Matuszewska M., Trigg S.B., Zhang M., Belgami D., Croft C., Liu J., El-Ouisi S., Greenhalgh J., Duboff J.S., Rahman T., Summers D.K.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 11742. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68693-w>
160. *Kim C.S., Li J.H., Barco B., Park H.B., Gatsios A., Damanian A., Wang R., Wyche T.P., Piizzi G., Clay N.K., Crawford J.M.* // *Cell Chem. Biol.* 2020. V. 27. № 6. P. 698–707.
161. *Han Q., Fang J., Li J.* // *Biochem. J.* 2001. V. 360. № 3. P. 617–623.

## The Ribosome Hibernation – Molecular Strategy of Bacterial Survival (Review)

E. A. Khaova<sup>a, b</sup>, N. M. Kashevarova<sup>a</sup>, and A. G. Tkachenko<sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, PFRC UB RAS, Perm, 614081 Russia*

<sup>b</sup> *Perm State University, Perm, 614990 Russia*

\**e-mail: agtkachenko@iegm.ru*

In this review, the mechanisms of bacterial cell survival mediated through the suppression of ribosomal functions by hibernation factors (HFs) are discussed. The HFs are the ribosome binding proteins displaying the following activities: inhibition of translation by 70S ribosomes (RaiA), formation of the inactive 100S ribosome dimers (RMF, HPF) or disordering the protein synthesis at different stages in the translation cycle (RsfS, YqjD, SRA, EttA). Hibernation factors initiate the formation of cell dormancy state that is characterized by low rate of metabolic processes responsible for the development of cell antibiotic tolerance and persister cell formation. The role of metabolic factors (polyamines, indoles) in the regulation of the expression levels of hibernation genes is discussed.

*Keywords:* bacteria, stress, ribosome hibernation, metabolism, adaptation, antibiotics tolerance, persistence

УДК 57.041.615.3

## ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МЕМБРАННОГО БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В УСЛОВИЯХ ИНГИБИРОВАНИЯ СИНТЕЗА ГЛУТАТИОНА

© 2022 г. Ю. В. Абаленихина<sup>1</sup> \*, П. Д. Ерохина<sup>1</sup>, П. Ю. Мыльников<sup>1</sup>,  
А. В. Щулькин<sup>1</sup>, Е. Н. Якушева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России,  
Рязань, 390026 Россия

\*e-mail: abalenihtina88@mail.ru

Поступила в редакцию 10.11.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Изучены функционирование и механизм регуляции Р-гликопротеина (Pgp) в условиях ингибирования синтеза глутатиона в клетках аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2), являющаяся моделью абсорбции ксенобиотиков *in vitro*. Синтез глутатиона ингибировали действием D,L-бутионинсульфоксимином (БСО, ингибитор  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы). Установлено, что БСО в концентрациях 50–500 мкМ и инкубации 3 ч не влиял на уровень глутатиона и снижал активность Pgp. Увеличение срока экспозиции с БСО в концентрациях 10–100 мкМ до 24 ч приводило к развитию умеренного окислительного стресса и повышению количества Pgp (эффект реализовался через транскрипционный фактор Nrf2). При этом активность Pgp увеличивалась при воздействии БСО в концентрации 10 мкМ и снижалась при концентрациях 100–500 мкМ. Развитие выраженного окислительного стресса при воздействии БСО в концентрации 500 мкМ в течение 72 ч, сопровождалось снижением количества и активности Pgp. Таким образом, БСО является прямым ингибитором Pgp, однако снижение уровня SH-групп, вызываемое данным веществом, приводило к повышению уровня Nrf2, который, в свою очередь, вызывал повышение количества и активности данного белка-транспортера. Полученные результаты можно использовать в клинической практике для оптимизации дозирования субстратов белка-транспортера при терапии заболеваний, сопровождающихся развитием окислительного стресса в кишечнике.

**Ключевые слова:** Р-гликопротеин, окислительный стресс, глутатион, DL-бутионинсульфоксимином, фексофенадин

**DOI:** 10.31857/S0555109922030023

Мембранные транспортные белки могут быть разделены на 4 типа: ионные каналы, транспортеры, аквапорины и АТФ-зависимые насосы. АТФ-зависимые насосы используют энергию АТФ для перемещения субстратов через мембраны против электрохимического градиента и среди них выделяют [1]: Р-тип (транспортирует ионы через цитоплазматическую мембрану), F-тип (обеспечивает синтез АТФ из АДФ во внутренней мембране митохондрий и обладает АТФазной активностью), V-тип (транспортирует H<sup>+</sup> через цитоплазматическую мембрану вакуолей растительных клеток и лизосом животных клеток) и ABC-транспортеры.

ABC-транспортеры (ATP-binding cassette) – АТФ-зависимые белки-транспортеры, обеспечивающие энергозависимый перенос веществ через цитоплазматические мембраны.

Самым изученным белком из суперсемейства ABC-транспортеров является Р-гликопротеин

(Pgp, ABCB1-белок, MDR1) – мембранный АТФ-зависимый эффлюксный белок с молекулярной массой 170 кДа, обладающий широкой субстратной специфичностью.

Молекула белка-транспортера представлена двумя гомологичными частями, которые соединены между собой подвижным линкерным полипептидом [2]. Каждая часть молекулы Pgp состоит из гидрофобного трансмембранного домена (TMD) и консервативного цитоплазматического домена, включающего АТФ-связывающий сайт (NBD) [3]. Благодаря особенностям своего строения Pgp способен выполнять транспорт экзогенных и эндогенных субстратов. К субстратам Pgp относят преимущественно липофильные вещества с молекулярной массой 330–4000 Да (холестерин, фосфатиды) [4], а также лекарственные средства: противоопухолевые, гипотензивные, антигистаминные фармакологические препара-

ты, сердечные гликозиды, антиагреганты, антикоагулянты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, иммунодепрессанты и др. [5].

Pgp изначально изучался в опухолевых клетках, где, как выяснилось, он обеспечивает механизмы резистентности опухолей к химиотерапии [6]. Однако экспрессия Pgp обнаружена и при физиологических состояниях организма. В настоящее время известно, что белок-транспортер Pgp локализован в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителиальных клетках почечных канальцев и участвует в транспорте эндогенных и экзогенных веществ, фармакокинетике лекарственных препаратов [7]. Кроме этого, из-за своей локализации в эндотелиальных клетках гистогематических барьеров (гематоэнцефалический барьер, гематоплацентарный барьер) Pgp участвует в защите забарьерных органов (мозг, тестикулы, плод) [8, 9]. В настоящее время доказано, для экспериментальных исследований классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике являются клетки линии Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека), гиперэкспрессирующие белок-транспортер Pgp при культивировании 21 сут.

В ряде исследований показано, что повышение количества и активности Pgp отмечается при патологических состояниях, например, болезни Альцгеймера [10], болезни Паркинсона [11], эпилепсии [12], онкологических заболеваниях (карцинома, саркома, лимфома) [13] и др., но механизмы данных изменений на данный момент окончательно не установлены. При указанных патологиях окислительный стресс (ОС) является одним из ключевых звеньев патогенеза.

ОС представляет собой дисбаланс между продукцией активных форм кислорода (АФК) и способностью клеток защититься от них. Решающую роль в механизмах антиоксидантной защиты играет глутатион (GSH) – тиолсодержащий трипептид. Глутатион обладает способностью связывать свободные радикалы, модулирует реакцию клеток на окислительно-восстановительные изменения, участвует в детоксикации метаболитов лекарственных препаратов [14], регулирует экспрессию генов и апоптоз [15], участвует в трансмембранном транспорте органических растворенных веществ [16].

Глутатион-зависимая регуляция Pgp является недостаточно изученным вопросом. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии ингибитора синтеза глутатиона – бутионинсульфоксимины (БСО) на экспрессию Pgp. Известно, что БСО в зависимости от времени экспозиции и концентрации может как снижать, так и повышать количество Pgp в эндотелиальных клетках сосудов головного мозга. Однако, механизм действия БСО и влияние изменения концентрации

глутатиона на экспрессию и активность Pgp не описаны.

Изучение влияния истощения глутатиона на количество и функциональную активность Pgp представляется актуальным и имеет важное практическое значение. Благодаря барьерной роли Pgp в ограничении всасывания в кишечнике лекарственных веществ, ингибирование или активация белка-транспортера может приводить к существенному изменению биодоступности его субстратов, что, в свою очередь, может приводить к снижению эффективности проводимой терапии (при повышении активности Pgp и снижении всасывания) или развитию побочных эффектов (при снижении активности белка-транспортера и повышении всасывания).

Учитывая то обстоятельство, что широкий спектр патологии кишечника сопровождается гиперпродукцией свободных радикалов, актуально исследование функционирования Pgp в условиях ОС, что может повысить эффективность и безопасность проводимой терапии.

Цель исследования – изучение функционирования и механизма регуляции активности мембранного белка-транспортера Pgp в условиях ингибирования синтеза глутатиона – модели эндогенного окислительного стресса.

## МЕТОДИКА

**Культивирование клеток линии Caco-2.** Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5%-ном содержании CO<sub>2</sub> в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4.5 г/л) (“Sigma-Aldrich”, США), содержащей L-глутамин (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”, США), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (“Sigma-Aldrich”, США), 100 Ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (“Sigma-Aldrich”, США) соответственно.

При степени покрытия клетками культуральной поверхности (конфлюентность) 70–90%, клетки снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0.25% трипсина и 0.2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, США), а затем высевали: в 96-луночный планшет (“Corning”, США) для оценки цитотоксичности DL-бутионинсульфоксимины; в 6-луночные планшеты (“Corning”, США) – для оценки влияния БСО на количество Pgp, Nrf2 и концентрацию карбонильных производных белков, содержание безбелковых и белковых SH-групп. Кроме того высевали в специальные трансвелл-системы (12 mm Transwell® with 0.4 μm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, “Corning”,

США) для оценки влияния БСО на проницаемость клеточных мембран для субстрата Pgp — фексофенадина. Клетки линии Caco-2 культивировали в течение 21 сут, поскольку за это время происходит их спонтанная дифференцировка в клетки, подобные энтероцитам тонкого кишечника, гиперэкспрессирующие Pgp.

Эндогенный окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду ингибитора синтеза глутатиона — D,L-бутионинсульфоксмин (БСО, “Sigma-Aldrich”, США) в конечных концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубацией в течение 3, 24 и 72 ч. Смену среды проводили каждые 24 ч. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

**Тест на выживаемость (цитотоксический тест).** Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета  $10^4$  кл. на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с БСО. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0.5%-ного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия). Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США) [17].

Выживаемость клеток Caco-2 в присутствии БСО рассчитывали по формуле:  $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$ , где ОП — оптическая плотность.

**Приготовление клеточных лизатов для анализа.** Клетки в количестве  $3 \times 10^6$  по окончании эксперимента снимали с 6-луночных планшетов раствором трипсин-ЭДТА.

Часть клеток ( $2 \times 10^6$ ) трехкратно промывали фосфатным буфером, pH 7.4 (“ПанЭко”, Россия), лизировали трехкратным проведением цикла замораживания-размораживания в 200 мкл буфера при  $-20^\circ\text{C}$  и использовали для проведения иммуно-ферментного анализа (ИФА).

Вторую часть клеток ( $1 \times 10^6$ ) промывали изотоническим раствором натрия хлорида (“Медпро”, Россия), добавляли 150 мкл лизирующего буфера, (50 мМ, трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ KCl, 0.5% Triton X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонилфлуорида гидрохлорид, AEBSF, 2 мМ, апротинин 0.3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1 мМ, эпоксисукциниллейцинуанидинобутиламид (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, “Sigma-Aldrich”, США), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали

для определения концентрации небелковых и белковых SH-групп.

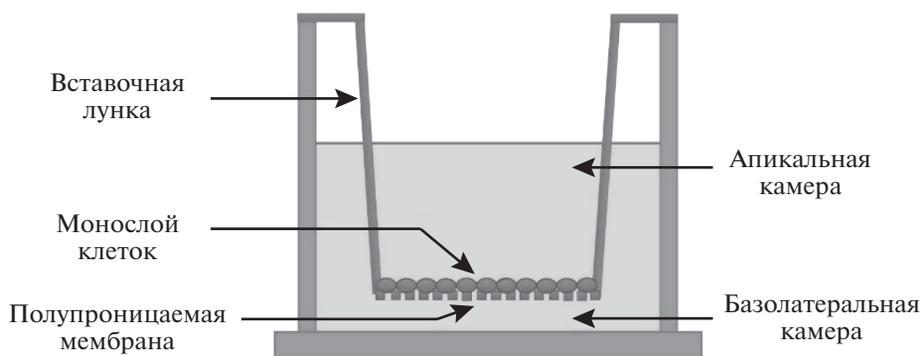
Аналогичным образом лизировали клетки, которые параллельно инкубировали в 6-луночных планшетах, для определения концентрации карбонильных производных белков из расчета  $3 \times 10^6$  кл. и 450 мкл лизирующего буфера.

**Анализ содержания Pgp и Nrf2 в клетках линии Caco-2.** В полученном лизате клеток методом ИФА определяли количество Pgp (Human Permeability glycoprotein ELISA kit, “Blue gene”, Китай) и Nrf2 (Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA kit, “Blue gene”, Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США). Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, “ThermoFisher”, США).

**Определение концентрации небелковых и белковых SH-групп.** Концентрацию белковых SH-групп определяли по разнице между уровнем общих и низкомолекулярных (небелковых) SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате клеток проводили по методу Элмана с 5,5'-дителиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB) в неденатурирующих условиях [18]. К 100 мкл образца добавляли 100 мкл 2 мМ DTNB (“Serva”, Германия) в 1 М трис-HCl буфере (pH 8.0) и 1000 мкл дистиллированной воды, после экспозиции 30 мин количественно оценивали содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на планшетном фотометре Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции  $\epsilon_{412} = 13.6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [19]. Для определения содержания низкомолекулярных SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой (“Химмед”, Россия), инкубировали на льду 15 мин, затем центрифугировали при 11000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия) 5 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1%-ного NaOH и использовали для определения низкомолекулярных SH-групп по реакции с DTNB.

**Определение концентрации карбонильных производных белков.** В полученном лизате клеток с помощью коммерческого набора определяли концентрацию продуктов карбонильных производных белков (“Sigma-Aldrich”, США).

Метод определения продуктов карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции  $\epsilon_{375} = 22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [20].



**Рис. 1.** Структура трансвелл-системы. Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью  $10^5/\text{см}^2$ . \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

Анализ проводили на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100.

**Оценка активности  $P_{gr}$ .** Активность  $P_{gr}$  оценивали по транспорту его маркерного субстрата – фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2. Для этого клетки культивировали в специальных трансвелл-системах (рис. 1). Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью  $10^5/\text{см}^2$  и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 (“Millipore”, США). При его значении выше  $500 \text{ МОм}/\text{см}^2$  выполняли эксперименты. Для этого в лунки трансвелл-системы добавляли питательную среду с БСО в тестируемых концентрациях. После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса (“Sigma-Aldrich”, США) с 25 мМ Хепес (“Sigma-Aldrich”, США) и 1% диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия). Затем добавляли субстрат  $P_{gr}$  – фексофенадин (“Sigma-Aldrich”, США) в апикальную камеру в конечной концентрации 150 мкМ [21]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата ( $a$ - $b$  транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования  $P_{gr}$ ).

В аналогичных трансвелл-системах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную ( $b$ - $a$  транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием  $P_{gr}$ ). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт маркерного субстрата рассчитывали по формуле [22]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{(AC_0)}$$

где  $P_{app}$  – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/сек),  $dQ/dt$  – изменение количества субстрата в камере реципиенте за время инкубации (мкМ · мл/с),  $A$  – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе ( $\text{см}^2$ ),  $C_0$  – начальная концентрация субстрата в камере-доноре, мкМ.

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости:  $b$ - $a$  к  $a$ - $b$ .

$$\text{Отношение коэффициентов} = \frac{P_{app} \ b - a}{P_{app} \ a - b}$$

Данный параметр является интегральным и оценивает общий вклад  $P_{gr}$  в транспорт фексофенадина через билипидную мембрану.

**Определение концентрации фексофенадина.** Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на ВЭЖХ хроматографе “Стайер” (Россия) по оригинальной методике [23]. Полученная проба транспортной среды (50 мкл), содержащая фексофенадин, разводилась до 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводились в хроматограф.

При анализе использовалась хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4.6) (США) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45°C, скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила (“PanReac AppliChem”, Испания), 267.4 мл воды деионизированной, 6.33 мл кислоты уксусной ледяной (“PanReac AppliChem”, Испания), с добавлением триэтиламина (“PanReac AppliChem”,

Испания) до pH 6.7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12.8 мин. Количественное определение проводилось методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1.2–57.4 мкМ.

**Статистический анализ.** Полученные результаты анализировали с помощью программ “StatSoft Statistica 13.0” и Microsoft Excel. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ . Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса, корреляционный анализ проводили с помощью критерия Пирсона. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

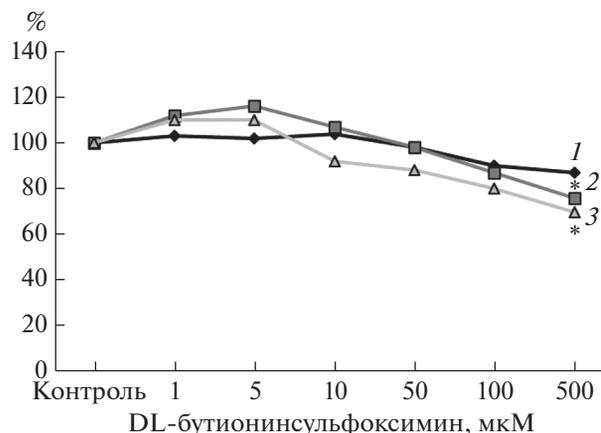
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки линии Сасо-2 – это клетки аденокарциномы ободочной кишки человека. При культивировании в виде монослоя данные клетки обладают способностью спонтанно дифференцироваться в клетки, подобные тонкокишечным энтероцитам, гиперэкспрессирующим белки-транспортёры, в том числе и Pgp [24]. Данная клеточная линия широко используется для исследования абсорбции лекарственных веществ и функционирования Pgp *in vitro*.

Известно, что Pgp локализован на апикальной мембране энтероцитов, что обуславливает его участие в ограничении проникновения лекарств из просвета кишечника в эпителиальные клетки и далее в системный кровоток.

Ключевую роль в синтезе и поддержании клеточного уровня глутатиона играет фермент  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетаза ( $\gamma$ -GCS), ингибитором которого является БСО [25]. Использование БСО в качестве специфического ингибитора синтеза глутатиона имеет преимущество относительно других глутатион-истощающих агентов (N-этилмалеимид, йодацетат, 2-йодацетамид), так как он не влияет на активность цитохрома P-450 и не изменяет оксидазную активность ферментов (поэтому метаболизм субстрата Pgp будет неизменным) [26].

**Цитотоксическое действие БСО на клетки линии Сасо-2.** Цитотоксическое действие БСО оценивалось по результатам МТТ-теста. В контрольной группе клеток выживаемость составила 100%. При воздействии БСО во всех используемых концентрациях жизнеспособность клеток линии Сасо-2 не изменялась при времени инкубации 3 ч. При концентрациях БСО 1–100 мкМ и инкубации 24 и 72 ч жизнеспособность клеток также не отличалась от значений контрольной группы, а при концентрации 500 мкМ снижалась на 23.9%



**Рис. 2.** Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 (%) в зависимости от концентрации DL-бутионинсульфоксимина при инкубации 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

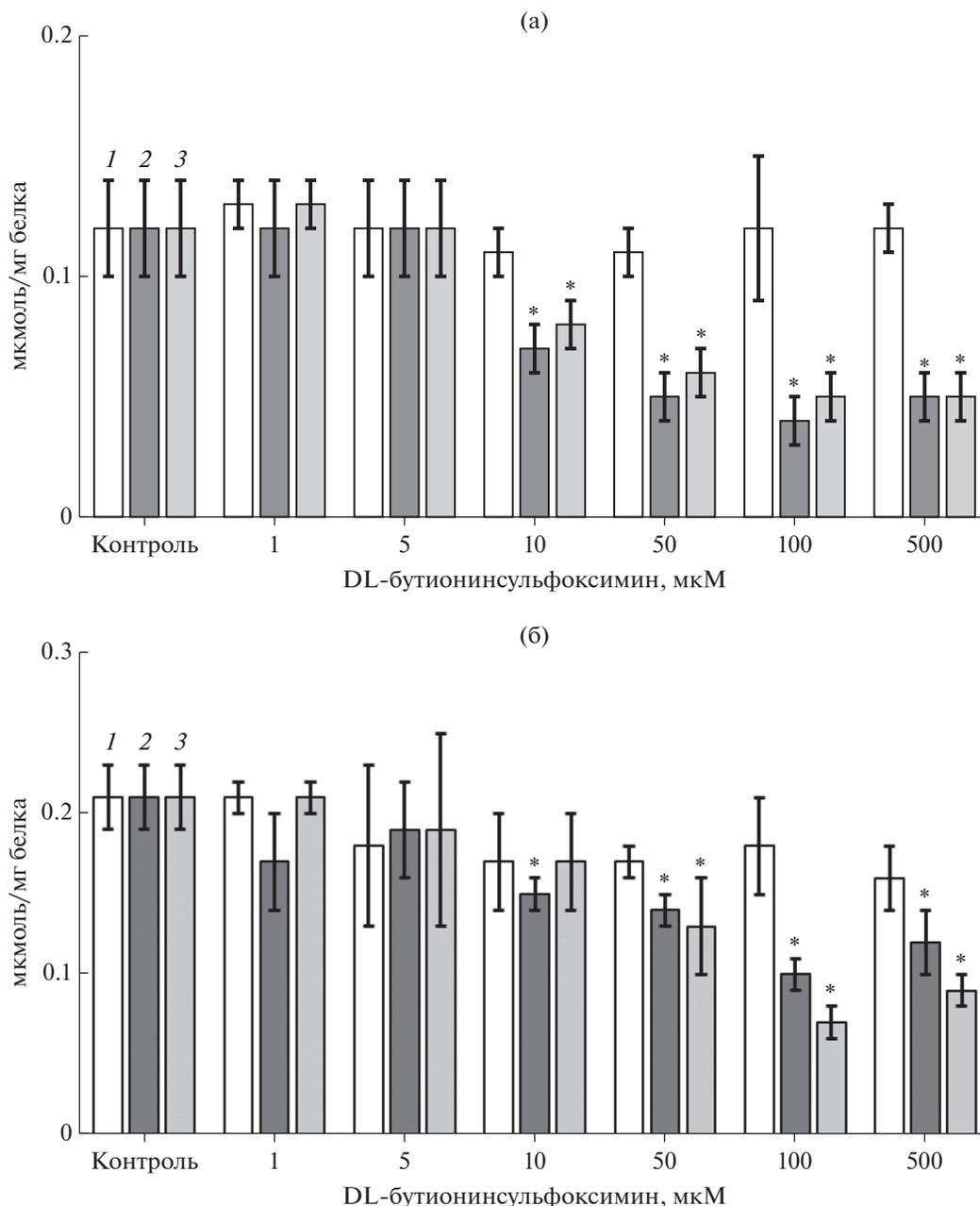
( $p = 0.003$ ) и 30.1% ( $p = 0.001$ ) соответственно (рис. 2).

**Оценка развития окислительного стресса в клетках линии Сасо-2 под действием БСО.** В условиях окислительного стресса наиболее чувствительна к действию АФК аминокислота – цистеин. Цистеин может входить как в состав белков (белковые тиолы), так и небелковых сульфгидрилов (небелковые тиолы).

Небелковые SH-группы в основном представлены глутатионом [27], поэтому оценку степени ингибирования синтеза глутатиона проводили по изменению их уровня.

При воздействии БСО в течение 3 ч в концентрациях 1–500 мкМ уровень небелковых SH-групп не изменялся. При увеличении длительности экспозиции до 24 и 72 ч и концентрации БСО 1 и 5 мкМ уровень небелковых SH-групп также не изменялся, однако при концентрациях БСО 10, 50, 100, и 500 мкМ отмечалось снижение уровня небелковых SH-групп на 40.7% ( $p = 0.002$ ) и 31.9% ( $p = 0.007$ ); 57.6% ( $p = 0.0004$ ) и 48.4% ( $p = 0.0006$ ); 67.8% ( $p = 0.0002$ ) и 62.3% ( $p = 0.0002$ ); 55.9% ( $p = 0.0004$ ) и 57.4% ( $p = 0.0002$ ) соответственно (рис. 3а).

При окислительном стрессе АФК взаимодействуют с простыми белками, в результате чего происходит модификация полипептидной цепи по аминокислотным остаткам [28]. Одной из наиболее важных и изученных является модификация цистеина. Атом серы тиольной группы (-SH) имеет несколько состояний окисления, поэтому модификация боковой цепи, содержащей цистеин, происходит до различных продуктов [29, 30]. Важность оценки окисления данной аминокислоты обусловлена тем, что цистеин



**Рис. 3.** Концентрация небелковых SH-групп (а, мкмоль/мг белка) и белковых SH-групп (б, мкмоль/мг белка) в клетках линии Сасо-2 под действием DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

встречается в виде консервативного остатка в функциональных участках белков, что позволяет рассматривать реакционноспособные SH-группы протеинов в качестве регуляторных центров [31, 32].

В ходе выполненного исследования было показано, что при воздействии БСО в течении 3 ч их концентрация не изменялась. При увеличении времени инкубации до 24 ч отмечалось снижение содержания белковых SH-групп на 25.5% ( $p = 0.02$ ) при концентрации БСО 10 мкМ, на 32.2% ( $p =$

$= 0.01$ ) – при 50 мкМ, на 50.0% ( $p = 0.001$ ) – при 100 мкМ и на 44.7% ( $p = 0.002$ ) – при 500 мкМ, а при концентрациях 1 и 5 мкМ достоверных отличий от контроля получено не было (рис. 3б).

При инкубации в течение 72 ч наблюдалось снижение уровня белковых SH-групп при воздействии на клетки линии Сасо-2 БСО в концентрациях 50; 100 и 500 мкМ на 37.1% ( $p = 0.03$ ); 64.9% ( $p = 0.008$ ) и 54.3% ( $p = 0.003$ ) соответственно, а при концентрациях 1–10 мкМ изменений не отмечалось (рис. 3б).

**Таблица 1.** Влияние БСО на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ )

БСО, мкМ	$P_{app} \text{ } b-a$ $\times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} \text{ } a-b$ $\times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} \text{ } b-a$ $\times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} \text{ } a-b$ $\times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} \text{ } b-a$ $\times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} \text{ } a-b$ $\times 10^{-6}$ см/с
	3 ч		24 ч		72 ч	
Контроль	3.02 ± 0.12	1.11 ± 0.37	2.81 ± 0.77	0.76 ± 0.17	2.98 ± 0.72	0.92 ± 0.17
1	3.18 ± 1.43	1.44 ± 0.42	2.83 ± 0.47	0.72 ± 0.16	3.27 ± 0.31	1.25 ± 0.44
5	3.08 ± 0.54	1.34 ± 0.77	2.76 ± 0.06	0.71 ± 0.11	1.95 ± 0.90	0.79 ± 0.12
10	2.72 ± 0.41	1.41 ± 0.38	4.09 ± 0.13*	0.76 ± 0.03	2.05 ± 0.72	0.74 ± 0.29
50	1.88 ± 0.45*	1.33 ± 0.33	2.24 ± 0.64	1.09 ± 0.27	1.14 ± 0.27*	0.92 ± 0.38
100	1.59 ± 0.28*	1.47 ± 0.29	1.52 ± 0.52*	1.09 ± 0.35	1.04 ± 0.10*	0.97 ± 0.26
500	1.29 ± 0.16*	1.31 ± 0.19	3.72 ± 0.11*	2.77 ± 0.25*	4.11 ± 0.49*	3.69 ± 0.87*

\*  $p < 0.05$  по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

Необратимыми белковыми продуктами окислительного стресса являются карбонильные производные белков, которые формируются за счет окисления нескольких аминокислотных остатков, а также взаимодействия с продуктами перекисного окисления липидов и редуцирующими сахарами, вследствие чего могут рассматриваться в качестве конечного продукта окислительного повреждения [28, 33].

Уровень карбонильных производных белков не изменялся при инкубации клеток с БСО в концентрациях 1–500 мкМ и времени экспозиции 3 ч, а также при концентрациях 1 и 5 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч.

Инкубация клеток линии Caco-2 с БСО в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 24 и 72 ч приводила к увеличению уровня карбонильных производных белков на 15.5% ( $p = 0.01$ ) и 36.6% ( $p = 0.004$ ); 19.8% ( $p = 0.003$ ) и 37.6% ( $p = 0.005$ ); 21.2% ( $p = 0.002$ ) и 63.1% ( $p = 0.0002$ ); 150.0% ( $p = 0.0002$ ) и 69.1% ( $p = 0.0002$ ) соответственно (рис. 4а).

Таким образом, в условиях воздействия БСО в концентрациях 10–500 мкМ в течение 24 и 72 ч на клетки линии Caco-2 наблюдалось снижение уровня небелковых SH-группы (за счет глутатиона), что приводило к развитию эндогенного окислительного стресса, характеризующегося повреждением белков по SH-группам и формированием карбонильных производных белков.

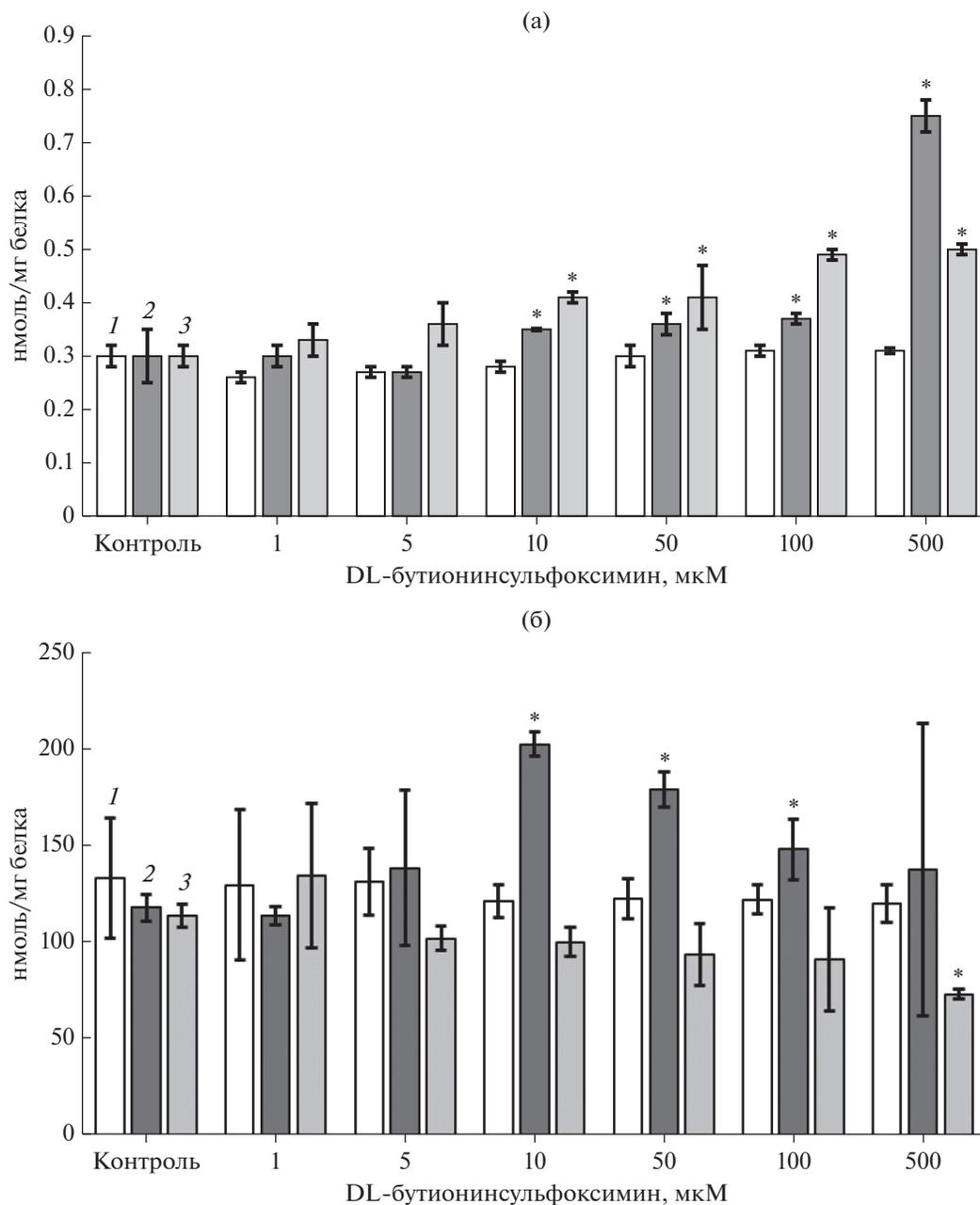
**Влияние БСО на количество и функциональную активность Pgp.** При воздействии БСО в течение 3 ч и концентрациях 1–500 мкМ количество Pgp статистически значимо не изменялось. Уровень Pgp при воздействии БСО в течение 24 ч и концентрациях 1, 5 и 500 мкМ не изменялся, но возрастал при концентрациях 10, 50 и 100 мкМ на 71.6% ( $p = 0.002$ ); 51.6% ( $p = 0.007$ ) и 25.4% ( $p = 0.05$ ) соответственно. При воздействии БСО в течение 72 ч и концентрациях 1–100 мкМ количество Pgp не

изменялось, а при 500 мкМ снижалось на 35.6% ( $p = 0.002$ ) (рис. 4б).

Для оценки активности Pgp клетки культивировали в трансвелл-системе, состоящей из двух камер – апикальной и базолатеральной. В ходе исследования оценивался транспорт фексофенадина – субстрата белка-транспортера из базолатеральной камеры в апикальную ( $P_{app} \text{ } b-a$ ), обусловленный пассивной диффузией и функционированием Pgp (модель транспорта веществ из кишечного эпителия в просвет кишечника). Также анализировали транспорт фексофенадина из апикальной камеры в базолатеральную ( $P_{app} \text{ } a-b$ ), обусловленный пассивной диффузией против работы Pgp (модель транспорта веществ из просвета кишки в кишечный эпителий, то есть всасывание). Кроме этого, рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости ( $b-a$ )/( $a-b$ ) для субстратов, который превышал значение “2”.

Коэффициент кажущейся проницаемости  $b-a$  фексофенадина составил  $2.94 \times 10^{-6} \pm 0.54 \times 10^{-6}$  см/с, коэффициент кажущейся проницаемости  $a-b$  –  $0.93 \times 10^{-6} \pm 0.26 \times 10^{-6}$  см/с. Из представленных данных видно, что транспорт обусловленный Pgp в 3.16 раз выше транспорта, происходящего за счет пассивной диффузии, против работы белка-транспортера ( $p = 0.013$ ) (табл. 1).

Воздействие БСО в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ в течение 3 ч приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости  $b-a$  на 37.7% ( $p = 0.001$ ), 47.4% ( $p = 0.001$ ) и 57.3% ( $p = 0.005$ ) (табл. 1) соответственно и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости ( $b-a$ )/( $a-b$ ) на 48.9% ( $p = 0.048$ ), 62.4% ( $p = 0.03$ ) и 65.9% ( $p = 0.03$ ) соответственно (рис. 5), что свидетельствовало о снижении активности белка-транспортера. Таким образом, учитывая отсутствие изменений количества Pgp при данном времени воздействия, полученные результаты свидетельствуют о том, что БСО является прямым ингибито-



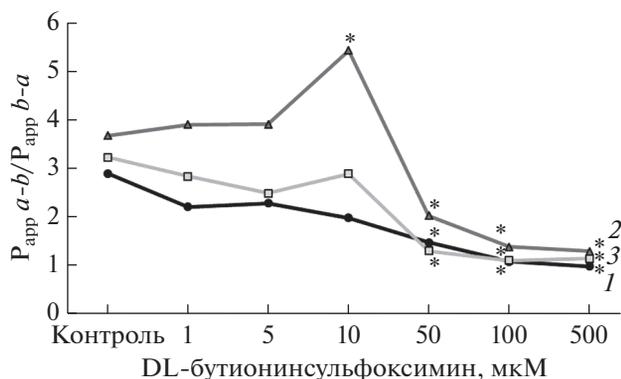
**Рис. 4.** Концентрация карбонильных производных белков (а, нмоль/мг белка) и изменение количества Pgr (б, нмоль/мг белка) в клетках линии Caco-2 под действием DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ( $M \pm SD, n = 3$ ). \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

ром активности Pgr (за счет непосредственного взаимодействия с молекулой белка-транспортера).

При увеличении длительности экспозиции до 24 ч было показано, что БСО в концентрации 10 мкМ вызывал увеличение коэффициента кажущейся проницаемости b-a на 45.6% ( $p = 0.028$ ) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости  $(b-a)/(a-b)$  на 47.2% ( $p = 0.02$ ), что и являлось проявлением повышения активности Pgr. На 24 ч инкубации отмечалось увеличение количе-

ства Pgr, что может указывать индукцию активации Pgr за счет синтеза белка, а не его активации.

При концентрации 50 мкМ отмечалось снижение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости  $(b-a)/(a-b)$  на 44.8% ( $p = 0.01$ ), а в концентрации 100 мкМ уменьшение коэффициента кажущейся проницаемости b-a на 45.9% ( $p = 0.029$ ) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости  $(b-a)/(a-b)$  на 62.2% ( $p = 0.002$ ), что свидетельствовало о снижении активности



**Рис. 5.** Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости ( $b-a$ )/( $a-b$ ) в клетках линии Caco-2 под действием DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ).

белка-транспортера, несмотря на увеличение его количества. Полученные результаты могут быть обусловлены повреждением молекулы белка-транспортера за счет усиления выраженности окислительного стресса, что подтверждалось увеличением концентрации карбонильных производных белков, а также прямой ингибирующей активностью БСО.

Дальнейшее повышение концентрации БСО до 500 мкМ приводило к увеличению коэффициента кажущейся проницаемости  $b-a$  и  $a-b$  на 32.4% ( $p = 0.05$ ) и 264.5% ( $p = 0.0003$ ). При этом отношение коэффициентов кажущейся проницаемости ( $b-a$ )/( $a-b$ ) снижалось по сравнению с контролем на 64.7% ( $p = 0.0002$ ), что свидетельствовало о снижении активности Pgp, повреждении клеточного монослоя и повышении транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера по обе стороны мембраны.

Воздействие БСО в концентрациях 50 и 100 мкМ в течение 72 ч приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости  $b-a$  на 61.7% ( $p = 0.001$ ) и 65.1% ( $p = 0.002$ ) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости ( $b-a$ )/( $a-b$ ) на 59.4% ( $p = 0.002$ ) и 65.6% ( $p = 0.002$ ), что указывало на снижение активности белка-транспортера.

При увеличении концентрации БСО до 500 мкМ отмечалось увеличение коэффициента кажущейся проницаемости  $b-a$  и  $a-b$  на 37.9 ( $p = 0.02$ ) и 301.1% ( $p = 0.0002$ ). При этом отношения коэффициентов кажущейся проницаемости ( $b-a$ )/( $a-b$ ) снижались по сравнению с контролем на 64.4% ( $p = 0.002$ ), что свидетельствовало о снижении активности Pgp, повреждении клеточного монослоя и повышении транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера по обе стороны мембраны.

Таким образом, при кратковременном воздействии БСО (3 ч) отмечалось его ингибирующее действие на Pgp, не связанное с изменением его количества (прямое ингибирование). При увеличении времени инкубации до 24 ч и концентрации БСО до 10 мкМ активность Pgp возрастала в соответствии с увеличением его количества. При увеличении концентрации БСО до 50 и 100 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч отмечалось снижение активности Pgp, что могло быть результатом повреждения молекулы белка-транспортера за счет усиления выраженности окислительного стресса (снижение концентрации белковых SH-групп и повышение карбонильных производных белков), а также прямой ингибирующей активности БСО.

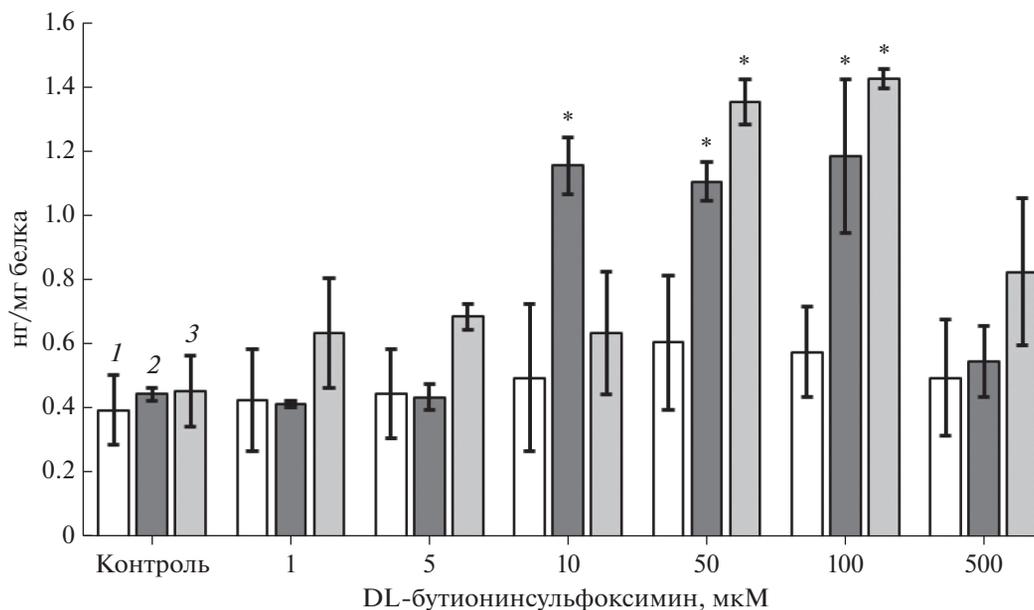
При концентрации БСО 500 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч отмечалось усиление окислительного стресса, повреждение целостности клеточного монослоя и повышении транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера по обе стороны мембраны.

**Механизмы регуляции Pgp в условиях моделирования ингибирования синтеза глутатиона.** В настоящее время известны несколько механизмов регуляции Pgp – это изменение экспрессии гена *MDR1* и его полиморфизм, стабилизация мРНК гена *MDR1*, изменение активности синтезированного белка-транспортера и изменение свойств цитоплазматических мембран [34].

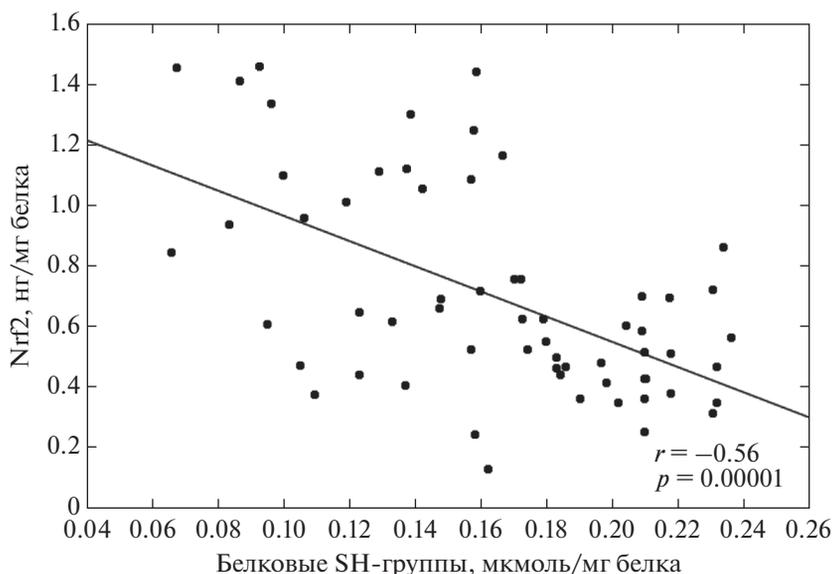
В условиях ОС отмечалась активация редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 (NF-E2-related factor 2), который защищает клетку от воздействия свободных радикалов и может вносить существенный вклад в регуляцию активности Pgp.

В условиях воздействия БСО в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч количество транскрипционного фактора Nrf2 не изменялось. При воздействии БСО в течение 24 ч и концентрациях 1, 5 и 500 мкМ количество Nrf2 также не изменялось, но возрастало при концентрации 10 мкМ на 157.8% ( $p = 0.005$ ), 50 мкМ – 146.7% ( $p = 0.0003$ ), 100 мкМ – 164.4% ( $p = 0.006$ ) соответственно. Воздействие БСО в течение 72 ч приводило к увеличению количества Nrf2 при концентрации ингибитора 50 мкМ на 195.7% ( $p = 0.001$ ), 100 мкМ – 210.8% ( $p = 0.001$ ), а при концентрациях 1, 5, 10 и 500 мкМ статистически значимого эффекта не оказывало (рис. 6).

В ходе исследования установлено, что в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкМ и времени инкубации 3–72 ч уровень Nrf2 был обратно пропорционален содержанию белковых SH-групп (рис. 7) ( $r = -0.56$ ,  $p = 0.00001$ ), что свидетельствовало об обратной зависимости между концентрацией восстановленных тиолов и экспрессией транскрипционного фактора Nrf2. Полученные



**Рис. 6.** Изменение количества Nrf2 в клетках линии Caco-2 под действием DL-бутионинсульфоксимида в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ( $M \pm SD$ ,  $n = 3$ ). \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

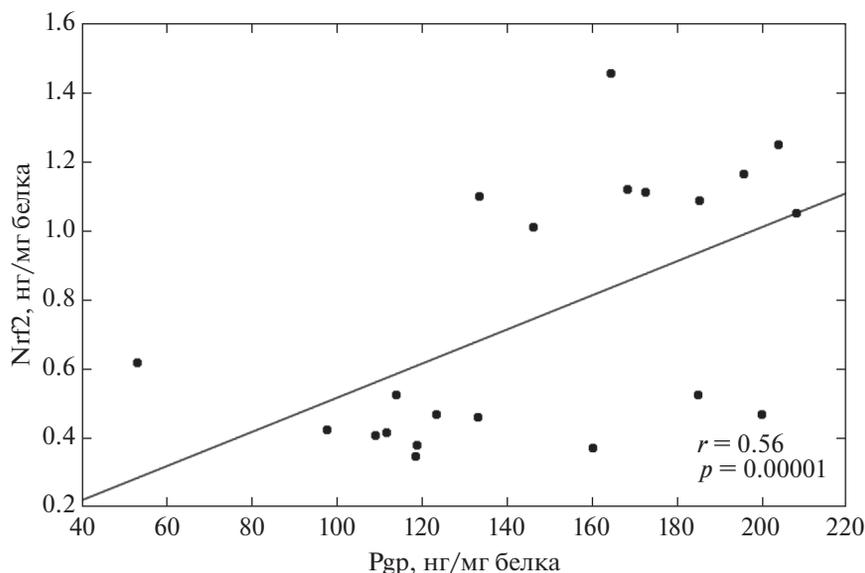


**Рис. 7.** Корреляционная зависимость между концентрацией белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) и количеством Nrf2 (нг/г белка) под действием DL-бутионинсульфоксимида в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3–72 ч. ( $r$  – коэффициент корреляции Пирсона;  $p$  – статистическая значимость результата по критерию Ньюмена–Кейлса).

результаты указывали на классический механизм регуляции транскрипции Nrf2 [31] в условиях воздействия ингибитора фермента  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы БСО.

Белковые SH-группы представляют собой молекулярные переключатели активности протеинов [32, 35]. Keap1 – белок репрессор транскрипционного фактора Nrf2, в своем составе имеет два остатка цистеина и является мишенью для окислительной модификации. В физиологическом состоянии

Nrf2 находится в комплексе с белком-репрессором Keap1, который функционирует как адаптерный белок. Keap1 способствует убиквитинированию и протеосомальной деградации Nrf2, а также предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро [36]. После активации (окисления остатков цистеина в молекуле Keap1) комплекс Keap1-Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с элементом антиоксидантного ответа (antioxidant-response elements, ARE). В свою оче-



**Рис. 8.** Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 (нг/мг белка) и Pgr (нг/мг белка) под действием DL-бутионин-сульфоксимиона в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 ч. ( $r$  – коэффициент корреляции Пирсона;  $p$  – статистическая значимость результата по критерию Ньюмена–Кейлса).

редь Nrf2 может участвовать в регуляции количества Pgr, поэтому проведен анализ взаимосвязи между количеством Nrf2 и количеством Pgr.

Анализ полученных результатов показал, что концентрация Pgr в лизате клеток Caco-2 была прямо пропорциональна содержанию Nrf2 в экспериментах с БСО только при инкубации в течение 24 ч в диапазоне концентраций 1–500 мкМ (рис. 8).

Таким образом, в ходе настоящего исследования было показано, что БСО является прямым ингибитором Pgr, что расширяет имеющиеся представления о структуре ингибиторов и может быть использовано для предсказания наличия ингибирующей активности у веществ с аналогичной структурой.

С другой стороны, установлено, что развитие умеренного окислительного стресса приводит к повышению количества и активности Pgr в энтероцитах кишечника, что может приводить к уменьшению абсорбции субстратов белка-транспортера и, следовательно, к снижению эффективности проводимой терапии. Развитие выраженного ОС, наоборот, привело к снижению количества и активности Pgr, увеличению проницаемости мембран клеток линии Caco-2 и могло сопровождаться повышением абсорбции субстратов белка-транспортера, увеличением их концентрации в плазме крови и, в конечном итоге, проявляться развитием нежелательных лекарственных реакций.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pedersen P.L. // J. Bioenerg. Biomembr. 2005. V. 37. № 6. P. 349–357.
2. Esser L., Zhou F., Pluchino K.M., Shiloach J., Ma J., Tang W., Gutierrez C., Zhang A., Shukla S., Madigan J.P., Zhou T., Kwong P.D., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Xia D. // J. Biol. Chem. 2017. V. 292. № 2. P. 446–461.
3. Sharom F.J. // Essays in Biochemistry. 2011. T. 50. C. 161–178.
4. Якушева Е.Н., Титов Д.С., Правкин С.К. // Успехи физиол. наук. 2017. Т. 48. № 4. С. 70–87.
5. Кулес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей. М.: Гэотар-Медиа, 2008. 304 с.
6. Dyson J., Foll F.L., Magal P., Noussair A., Pasquier J. // J. Theor Biol. 2019. V. 14. № 461. P. 239–253.
7. Ieiri I., Takane H., Otsubo K. // Clin. Pharmacokinet. 2004. V. 43. № 9. P. 553–576.
8. Черных И.В., Шулькин А.В., Гацанова М.В., Попова Н.М., Есенина А.С., Градинарь М.М., Якушева Е.Н. // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2019. Т. 7. № 1. С. 46–52.
9. Han L.W., Gao C., Mao Q. // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2018. V. 14. № 8. P. 817–829.

10. Chai A.B., Leung G.K.F., Callaghan R., Gelissen I.C. // *FEBS J.* 2020. V. 287. № 4. P. 612–625.
11. Furuno T., Landi M.T., Ceroni M., Caporaso N., Bernucci I., Nappi G., Martignoni E., Schaeffeler E., Eichelbaum M., Schwab M., Zanger U.M. // *Pharmacogenetics.* 2002. V. 12. № 7. P. 529–534.
12. Wang G.X., Wang D.W., Liu Y., Ma Y.H. // *Int. J. Neurosci.* 2016. V. 126. № 5. P. 385–392.
13. Muñoz-Pérez M.J., Casco S., Garza-González M.D.C., Soto-Vega E. // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2018. V. 40. № 8. P. 490–494.
14. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 1–2. P. 1–12.
15. Jefferies H., Coster J., Khalil A., Bot J., McCauley R.D., Hall J.C. // *ANZ J. Surg.* 2003 V. 73. № 7. P. 517–522.
16. Oestreicher J., Morgan B. // *Biochem. Cell Biol.* 2019. V. 97. № 3. P. 270–289.
17. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M. J. // *Methods Mol. Biol.* 2015. № 1250. P. 333–348.
18. Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Dorsselear A.V., Branlant G. // *J. Biol. Chem.* 2000. № 275. P. 35908–35913.
19. Ellman L.G. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. № 82. P. 70–77.
20. Weber D., Davies M.J., Grunea T. // *Redox Biol.* 2015. № 5. P. 367–380.
21. Petri N., Tannergren C., Rungstad D., Lennernäs H. // *Pharmac. Res.* 2004. V. 21. № 8. P. 1398–1404.
22. Elshy R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A.J. // *Xenobiotic.* 2008. № 38. P. 1140–1164.
23. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. // *Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова.* 2020. Т. 28. № 2. P. 135–142.
24. Müller J., Keiser M., Drozdik M., Oswald S. // *Biol. Chem.* 2017. V. 398. № 2. P. 175–192.
25. Haddad J.J. // *Eur. Cytokine Netw.* 2001. V. 12. № 4. P. 614–624.
26. Drew R., Miners J.O. // *Biochem. Pharmacol.* 1984. V. 33. № 19. P. 2989–2994.
27. Nagy L., Nagata M., Szabo S. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. № 14. P. 2053–2060.
28. Луцк В.И. // *Биохимия.* 2007. Т. 72. № 8. С. 995–1017.
29. Reddie K.G. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. № 6. P. 746–754.
30. Forman H.J. *Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems* [Internet]. / Ed. L.J. Berliner, N.L. Parinandi. Cham (CH): Springer, 2020. Chapter 1. 251 p.
31. Poole L.B., Nelson K.J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. № 1. P. 18–24.
32. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. № 5. P. 543–555.
33. Spickett C.M., Pitt A.R. // *Essays Biochem.* 2020. V. 64. № 1. P. 19–31.
34. Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М. // *Успехи физиол. наук.* 2014. Т. 45. № 4. С. 89–98.
35. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R., Wessjohann L.A., Seliger B. // *Cell Communication and Signaling.* 2015. № 13. e39.
36. Wen Zh., Liu W., Li X., Chen W., Liu J., Wen Zh., Liu Zh. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. Article ID 1759149. <https://doi.org/10.1155/2019/1759149>

## Functioning of the P-Glycoprotein Membrane Transport Protein under Conditions of Inhibition of Glutathione Synthesis

Yu. V. Abalenikhina<sup>a</sup>\*, P. D. Erokhina<sup>a</sup>, P. Yu. Mylnikov<sup>a</sup>, A. V. Shchulkin<sup>a</sup>, and E. N. Yakusheva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ryazan State Medical University Named after Academician I.P. Pavlov, Ryazan, 390026 Russia

\*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

The functioning and mechanism of P-glycoprotein (Pgp) regulation under conditions of inhibition of glutathione synthesis in human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells, which are a model of xenobiotic absorption *in vitro*, were studied. The glutathione synthesis was inhibited by the action of DL-butionine sulfoxime (BSO, an inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteinesynthetase). It was found that BSO at concentrations of 50–500  $\mu$ M and incubation for 3 h had no effect on the level of glutathione and reduced Pgp activity. An increase in the exposure time with BSO at concentrations of 10–100  $\mu$ M to 24 h led to the development of moderate oxidative stress and an increase in the amount of Pgp (the effect was realized through the transcription factor Nrf2). At the same time, Pgp activity increased when exposed to BSO at a concentration of 10  $\mu$ M and decreased at concentrations of 100–500  $\mu$ M. The development of pronounced oxidative stress upon exposure to BSO at a concentration of 500  $\mu$ M for 72 h was accompanied by a decrease in the amount and activity of Pgp. Thus, BSO is a direct inhibitor of Pgp, however, a decrease in the level of SH groups caused by this substance can lead to an increase in the level of Nrf2, which, in turn, causes an increase in the amount and activity of this transport protein. The obtained results can be used in clinical practice to optimize the dosing of transport protein substrates in the treatment of diseases accompanied by the development of oxidative stress in the intestine.

**Keywords:** P-glycoprotein, oxidative stress, glutathione, DL-butionine sulfoxime, fexofenadine

УДК 579.6.606

## АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА И ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ У ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

© 2022 г. А. Е. Куварина<sup>1</sup>, \*\*, Ю. А. Рощка<sup>1</sup>, Е. А. Рогожин<sup>1, 2</sup>,  
Д. А. Никитин<sup>3</sup>, А. В. Кураков<sup>4</sup>, В. С. Садыкова<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997 Россия

<sup>3</sup>Почвенный институт им. В.В. Докучаева, Москва, 119017 Россия

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: sadykova\_09@mail.ru

\*\*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

Поступила в редакцию 13.12.2021 г.

После доработки 30.12.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Исследовали способность представителей психротолерантных микромицетов к продукции антимикробных соединений. В результате скрининга отобран (из 98 культур) перспективный продуцент антибиотиков *Penicillium vulpinum* КПБ F-290. Продуцент проявлял активность в отношении условно-патогенных грибов и бактерий. Выделенные активные фракции могут быть отнесены к группе антимикробных соединений, в том числе к  $\beta$ -лактамам антибиотикам и пептидам.

**Ключевые слова:** антимикробные соединения, психротолерантные микромицеты, антибиотики

**DOI:** 10.31857/S0555109922030084

Одной из актуальных задач медицинской биотехнологии и фармакологии является поиск и выделение новых природных антимикробных соединений, которые послужили бы основой для создания лекарственных препаратов. Особый интерес вызывают антимикробные вещества, эффективные в отношении возбудителей заболеваний, устойчивых к применяемым в медицинской практике антибиотикам [1–3].

Для поиска природных биологически активных соединений в разные периоды применялись различные стратегии: от традиционного фенотипического скрининга до внедрения достижений в геномике, транскриптомике, протеомике, метаболомике и других технологий [4].

В последнее десятилетие поиск новых соединений с биологической активностью ведут среди продуцентов, выделенных из экстремальных экосистем — морей, засоленных грунтов и других источников [5]. За прошедшие 10–15 лет было выделено и охарактеризовано более 20000 таких соединений [6, 7].

На сегодняшний день имеются сведения о перспективных антимикробных метаболитах микроорганизмов, выделенных, в основном, в местах с тропическим климатом, однако, относительно ма-

ло сведений о метаболитах обитателей холодных мест Арктики, Антарктики и придонных вод глубоководных озер [8].

По литературным данным антимикробный потенциал изолятов холодных местообитаний частично изучен у прокариот [9], в то время как в отношении микромицетов таких исследований практически не проводилось до настоящего времени. Микромицеты холодных местообитаний могут оказаться неосвоенным, ценным источником новых продуцентов, поскольку их выживание в полярных условиях требует высокой адаптивности, устойчивости ко многим стрессам. К ним относят низкую доступность питательных веществ, значительное УФ-излучение, длительное воздействие частого колебания температуры в сторону отрицательных значений и т.п. Все вышеперечисленные факторы в совокупности способствуют эволюционной адаптации так называемых психрофильных микроорганизмов и синтезу у них специфических метаболитов [10, 11]. Ряд вторичных метаболитов с антимикробной активностью был выделен из изолятов арктических и антарктических грибов [12, 13], среди которых было установлено пять новых биоактивных производных астерриновой кислоты, продуцентом которых является арктический

аскомицет *Pseudogymnoascus* sp. Соединения проявляли антифунгальную активность в отношении *Aspergillus fumigatus*, а также некоторые показали антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий [14].

*Penicillium griseofulvum*, выделенный из почв Гренландии, продуцирует ряд вторичных метаболитов, в том числе гризеофульвин, фульвокислоту, мицелианамид, рокфортин С, рокфортин D, ханоклавин I и элимоклавин. Все вещества проявляли антимикробную активность [15]. В работе [16] у *Spirromastix* sp. из глубоководных отложений Южного Атлантического океана были выделены новые соединения с уникальной структурой. Установлено, что арктический изолят *Penicillium nalgiovense* способен синтезировать амфотерицин В [17], а штамм *Geomyces* sp. 2481 – антимикотик геомицин В и антибактериальный компонент геомицин С [18]. Психротолерантный штамм *Penicillium algidum* синтезирует новый циклический нитропептид под названием психрофилин D [19], активный в отношении линий клеток лейкемии мышей р388. Еще один психротолерантный изолят микромицета *Penicillium* sp. PR19 N-1 продуцирует редкие новые сесквитерпеновые соединения эремофиланового типа. Их цитотоксические исследования показали умеренную активность в отношении линий клеток человека HL-60 (промиелоцитарная лейкемия) и A-549 (карцинома лёгкого) [20].

Предполагается, что даже известные антибиотики психрофильных штаммов могут отличаться по своей структуре от синтезируемых мезофильными микроорганизмами, что может оказаться важным аспектом в борьбе с резистентными формами патогенных и условно-патогенных микроорганизмов человека, проявляющих устойчивость к применяемым в медицинской практике антибиотикам [21].

Цель работы – оценка антибиотической активности коллекции психрофильных микромицетов, выделенных из различных почв Арктики и Антарктики и донных грунтов озера Байкал, и влияния температуры на метаболическую активность и биосинтез антибиотиков.

## МЕТОДИКА

В работе были использованы 98 штаммов психрофильных и психротолерантных микромицетов из коллекции культур грибов экстремальных местообитаний МГУ им. М.В. Ломоносова, 21 из которых были выделены из грунтов Антарктиды [22–25] и 77 из грунтов (глубина 5–250 м) озера Байкал [26].

Для определения видовой принадлежности штаммов предварительно была проведена идентификация по культурально-морфологическим при-

знакам. Выделение ДНК из чистых культур микромицетов проводили по методике Глушаковой с соавт. [27]: биомассу 5–6-суточной культуры переносили в пробирки эппендорфа на 2 мл, добавляли 400 мкл стеклянных шариков (300–500 мкм диаметром) и 500 мкл лизирующего буфера: Tris-Base – 50 мМ, NaCl – 250 мМ, ЭДТА 50 мМ, ДДС – 0.3%, pH 8.0. Приготовленную смесь взбалтывали на вортексе на скорости 3500 об./мин в течение 15 мин, затем инкубировали 1 ч при температуре 65°C, после снова взбалтывали на вортексе 15 мин и центрифугировали при 13400 g 10 мин, затем отбирали надосадочную жидкость.

Для амплификации региона рДНК, содержащего D1/D2 домен региона 26S рДНК, использовали праймеры ITS1f (5' CTTGGTCATTTAGAG-GAAGTA) и NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGAC-GG) и смеси для ПЦР ScreenMix (ЗАО “Евроген”, Москва).

Амплификатор использовали по следующей программе: (начальная денатурация – 2 мин при температуре 96°C; затем 35 циклов: денатурация – 20 с при температуре 96°C, отжиг праймеров – 50 с при температуре 52°C, синтез ДНК – 1.5 мин при температуре 72°C; конечная достройка 7 мин при температуре 72°C). Очистку ПЦР-продукта проводили с использованием набора BigDye X Terminator Purification Kit (“Applied Biosystems”, США). Для секвенирования использовали праймер NL4.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer в Научно-производственной компании “Синтол” (Москва). Идентификацию по полученным хроматограммам проводили, используя данные Генбанка NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и SABI Bioscience Database Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>).

Способность к синтезу антимикробных соединений оценивали методом блоков [28]. Для дальнейших исследований отбирали штаммы, которые проявили максимальную антибиотическую активность, и затем культивировали их в жидких средах. Использовали стандартные питательные среды Чапека и Сабуро. Микромицеты выращивали стационарным способом в колбах Эрленмейера на 750 мл в течение 14 сут или глубинным способом на шейкере-инкубаторе Innova 40R (“Eppendorf New Brunswick”, США). Культуральную жидкость (КЖ) отделяли фильтрацией через мембранные фильтры на воронке Зейца под вакуумом. Затем КЖ экстрагировали этилацетатом или бутанолом в соотношении 5 : 1 3 раза. Полученные экстракты упаривали в вакууме на роторном испарителе “Rotavapor-RBüchi” (Швейцария) при 42°C досуха, остаток растворяли в водном 50%-ном эта-

ноле и получали спиртовые концентраты. Анти-микробную активность определяли в исходной КЖ, в спиртовых экстрактах КЖ и экстрактах мицелия с помощью стерильных бумажных дисков (“НИИ Пастера”, Россия), смоченных в экстрактах и высушенных в стерильных условиях. В качестве контроля использовали стандартные диски с флуконазолом для грибов (40 мкг, “НИИ Пастера”, Россия) и амоксицилином/клавулоновой кислотой для бактерий (20/10 мкг, “НИИ Пастера”, Россия). Для оценки фунгицидной активности использовали тест-штаммы: плесневый гриб *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжи *Candida albicans* ATCC 2091.

Антибактериальную активность оценивали с помощью тест-штаммов: грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922; грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633; грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* 209P и *Micrococcus luteus* NCTC 8340; пекторбактерии *P. carotovorum* и *P. savastanoi*.

Тест-культуру *B. subtilis* ATCC 6633 выращивали на среде Гаузе № 2 следующего состава (г/л): триптон – 2.5 (или бульон Хоттингера – 30 мл), пептон – 5, хлорид натрия – 5, глюкоза – 10; *S. aureus* 209P и *M. luteus* NCTC 8340 выращивали на среде МПА (“ЗАО НИЦФ”, Россия), а *E. coli* ATCC 25922 на среде LB (триптон-соевый агар). Тест-культуры *P. carotovorum* и *P. savastanoi* выращивали на среде LB с добавлением 0.5% глюкозы. Культуры микромицетов *A. niger* INA 00760 и *C. albicans* ATCC 2091 – на среде Чапека. Предварительно культуры выращивали в пробирках со скошенным питательным агаром, после чего их клетки суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland ( $1.5 \times 10^8$  КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Использовали суточные культуры бактерий и пятисуточные культуры грибов и дрожжей. Все тест-культуры получены из коллекции культур НИИ по изысканию новых антибиотиков.

Анализ и разделение на активные фракции экстрактов культуральной жидкости наиболее перспективных в качестве продуцентов штаммов психротолерантных микромицетов осуществляли методом аналитической обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [29] с использованием аналитической колонки XBridge 5 мкм 130 Анг размером 250 × 4.6 мм (“Waters”, Ирландия) в линейном градиенте повышения концентрации ацетонитрила в качестве подвижной фазы (элюент А – 0.1%-ная трифторуксусная кислота, ТФУ, в деионизованной воде MQ, элюентом В – 80%-ный ацетонитрил с 0.1%-ной водной ТФУ) при скорости потока 950 мкл/мин. Для ОФ-ВЭЖХ использовали ультраградиентный ацетонитрил фирмы “Panreac” (Испания) и ТФУ производства “Sigma-Al-

drich” (США). Детектирование разделяемых веществ осуществляли при длине волны 214 нм в градиенте концентрации элюента В: 16–28% – за 12 мин; 28–55% – за 20 мин; 55–85% – за 30 мин и 85–95% – за 5 мин с последующим изократическим элюированием в течение 10 мин.

Для наработки фракций для последующего проведения структурно-функционального анализа однократно нанесли 300 мкл концентрата на аналитическую колонку для обращенно-фазовой ОФ-ВЭЖХ XBridge ВЕН 130 Анг 4.6 × 250 мм 5 мкм (Waters, Ирландия) при скорости потока подвижной фазы 1.1 мл/мин. Линейный градиент 16–70% буфера В (80% ацетонитрил в 0.1% ТФУ) за 50 мин с дальнейшим 70–95% В за 5 мин и изократическим элюированием в течение 15 мин. Детектирование поглощения было осуществлено при длине волны 220 нм.

Модификация N-концевой аминогруппы активированным эфиром Coumarin 343 X осуществляли по следующей методике [30].

Лиофилизованное вещество (~200 мкг) растворяли в 500 мМ PBS  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  буфере с pH 7.28, для получения концентрации ~ 1 мг/мл. К полученному раствору добавляли 1080 мкл раствора активированного эфира Coumarin 343 XFITC (“Sigma-Aldrich”, США) в 80%-ном водном диметилформамиде (ДМФ) в концентрации 4010 мкг/мл, тщательно перемешивали, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре 37°C в темноте. Продукты реакции разделяли методом аналитической ОФ-ВЭЖХ на колонке XBridge ВЕН С18 4.6 × 250 мм (“Waters”, Ирландия) в линейном градиенте растворителя В (80%-ный  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0.1%-ная ТФУ) от 16 до 28% в течение 12 мин; (основной) и 28–55% за 10 мин; 55–85% за 20 мин (дополнительный) при скорости потока 0.935 мл/мин. Поглощение детектировали при длинах волн 214 и 437 нм.

Молекулярные массы активных пиков соединений определяли методом ультра высокоэффективной жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией (UHPLC-MS) с использованием установки для масс-спектрометрии типа “ионная ловушка” Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus (ThermoFisher Scientific, США) и хроматографа высокого давления Thermo Accela UPLC (ThermoFisher Scientific, США), укомплектованного микроколонкой YMC Triart ( $\text{C}_{18}$  150 2 мм, 1.9  $\mu\text{m}$ ) (YMC Co., Япония) [31]. Детектирование сигнала осуществляли по полному ионному току при распылении электроспреем ESI(+), 150–2000 au. Образцы растворяли в смеси вода/метанол/уксусная кислота (88 : 10 : 2) до конечной концентрации примерно 1 мг/мл.

Спектры поглощения активных соединений в диапазоне 200–600 нм снимали с использованием спектрофотометра UV-1800 (“Shimadzu”, Япония)

**Таблица 1.** Общее количество культур (%), проявивших активность в отношении тест-штаммов *B. subtilis* ATCC 6633 и *A. niger* INA 00760

Экосистема	Всего культур	Неактивные		Слабоактивные		Умеренно активные		Высоко-активные	
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>A. niger</i> INA 00760	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>A. niger</i> INA 00760	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>A. niger</i> INA 00760	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>A. niger</i> INA 00760
Озеро Байкал	77	13 (16.9%)	57 (74%)	35 (45.5%)	12 (15.6%)	5 (6.5%)	6 (7.8%)	24 (31.1%)	2 (2.6%)
Антарктида	21	7 (33.3%)	12 (57.1%)	8 (38.1%)	8 (38.1%)	5 (23.8%)	1 (4.8%)	1 (4.8%)	0

Примечание. Зона подавления роста тест-штаммов неактивными штаммами – 0 мм; слабоактивными – 1–15 мм; умеренно активными – 16–20 мм; высокоактивными – 21 мм и более.

с применением кварцевых кювет объемом 2 мл с длиной оптического пути 1 см.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка антимикробной активности 77 штаммов из донных грунтов озера Байкал в отношении микромицетов и бактерий показала, что для культур в основном характерна антибактериальная активность. Так, доля обладающих антимикотическим действием в отношении *A. niger* INA 00760, составляла 2.6%, в то время как с антибактериальным действием в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 составила 31.1% от общего числа исследуемых штаммов (табл. 1). Наибольшую антибактериальную активность проявили представители родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Coniochaeta* и *Daldinia*, а наибольшую антимикотическую активность проявили, в основном, представители микромицетов рода *Trichoderma*. Важно отметить, что в данном случае представители микромицетов рода *Trichoderma* и *Penicillium* встречались чаще других среди выделенных изолятов [32, 33].

Оценка антимикробной активности 21 изолята почв Антарктиды в отношении тест-штаммов позволила выявить относительно немного, а именно, 4.8% культур, проявивших высокую антибактериальную активность и относящихся к представителям рода *Penicillium*. Стоит отметить, что ни один из протестированных изолятов не обладал высокой антимикотической активностью.

Таким образом, исходя из полученных нами результатов, среди психротолерантных штаммов преобладает антибактериальная активность. Данная специфичность может быть объяснена тем, что бактериальное сообщество этих почв представлено намного большим видовым разнообразием, в сравнении с микромицетами. Итак, продукция антибиотиков, по-видимому, является эффективным приемом межвидовой конкуренции среди грибов этих экониш. В конечном итоге, для дальнейшего исследования были отобраны наи-

более активные культуры, которые на данный момент практически не изучены в качестве продуцентов антибиотиков для медицинской и фармацевтической промышленности [34]: *Cadophora luteo-olivacea* МТ303851, *Acremonium zonatum* МТ303852, *Cladosporium cladosporioides* КПБ F-288, *Penicillium vulpinum* КПБ F-290, *Antarctomyces psychrotrophicus* МТ303855, *Sarocladium kiliense* КПБ F-292 (табл. 2).

Оценка скорости роста культур на различных синтетических и натуральных средах показала, что все штаммы имели высокую скорость роста на двух стандартных средах: синтетической среде Чапека и среде Сабуру. В дальнейшем эти жидкие среды использовали для оценки способности к синтезу антибиотиков. Антибиотические вещества накапливались преимущественно в КЖ штаммов, а не в мицелии. Определение относительной концентрации активных соединений выявила максимальное содержание антибиотических веществ при культивировании при 20°C для всех 6 культур.

Влияние микробной конкуренции на синтез антимикробных соединений психрофильными микромицетами, по литературным данным, наиболее выражено в летний период, когда более высокие температуры приводили к повышению общей активности грибов [35]. В текущем исследовании мы также продемонстрировали, что повышение температуры явно влияет на продукцию вторичных метаболитов и увеличивает синтез антибиотиков.

Изменения температуры, происходящие в различных временных масштабах (от суточных до сезонных и более длительных периодов), могут иметь важное влияние на выживание и эволюцию микроорганизмов. В полярных почвах антибиотическая активность была продемонстрирована при температуре до 15°C [36–38].

Для дальнейшего изучения был отобран наиболее перспективный штамм *Penicillium vulpinum* КПБ F-290, проявивший максимальную антимикробную активность в отношении тест-культур.

**Таблица 2.** Антимикробная активность отобранных штаммов при различных температурах\*

Изоляты	Тест-организмы	Зоны ингибирования роста (мм) при разных температурах культивирования	
		15°C	20°C
<i>Cadophora luteo-olivacea</i> МТ303851	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	7 ± 0.3	18 ± 0.3
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0
	<i>A.niger</i> INA 00760	6 ± 0.1	10 ± 0.1
	<i>C.albicans</i> ATCC 2091	6 ± 0.2	10 ± 0.2
<i>Acremonium zonatum</i> МТ303852	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	8 ± 0.2	10 ± 0.6
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0
	<i>A.niger</i> INA 00760	6 ± 0.1	9 ± 0.2
	<i>C.albicans</i> ATCC 2091	8 ± 0.4	17 ± 0.3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> КПБ F-288	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	0	0
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	6 ± 0.3	10 ± 0.2
	<i>A.niger</i> INA 00760	0	0
	<i>C.albicans</i> ATCC 2091	0	0
<i>Penicillium vulpinum</i> КПБ F-290	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	10 ± 0.5	31 ± 0.4
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	9 ± 0.4	25 ± 0.1
	<i>A.niger</i> INA 00760	8 ± 0.1	15 ± 0.1
	<i>C.albicans</i> ATCC 2091	9 ± 0.3	22 ± 0.3
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i> МТ303855	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	0	0
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0
	<i>A.niger</i> INA 00760	0	0
	<i>C.albicans</i> ATCC 2091	7 ± 0.1	10 ± 0.6
<i>Sarocladium kiliense</i> КПБ F-292	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	6 ± 0.1	10 ± 0.2
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0
	<i>A.niger</i> INA 00760	0	0
	<i>C.albicans</i> ATCC 2091	0	0

\* Экстракты, из КЖ культур, выращенных при 4 и 10°C, не ингибировали рост тест-штаммов, зон подавления роста не наблюдали.

Штамм *P. vulpinum* КПБ F-290 растет при температурах от 10 до 25°C, с оптимумом около 20°C, не продуцирует антибиотики при температуре ниже 15°C, при этом был способен интенсивно секретировать метаболиты с антимикробной активностью в культуральную жидкость на 12–14 сут роста.

Штамм *P. vulpinum* КПБ F-290 проявлял высокую антимикробную активность в отношении условно-патогенных штаммов и *B. subtilis* ATCC 6633. Величины зон подавления роста этих культур достигали 15 ± 2 и 31 ± 2 мм соответственно. Также штамм был активен в отношении фитопатогенных пектобактерий *P. carotovorum* и *P. savastanoi*, вызывающих мокрую гниль картофеля, и проявлял незначительную анти-

микробную активность как при поверхностном, так и при глубинном культивировании в отношении *St. aureus* 209P и *M. luteus* NCTC 8340. С целью увеличения биосинтеза антибиотического комплекса были апробированы различные способы культивирования: поверхностное (стационарное) и глубинное с использованием шейкера-инкубатора (табл. 3). Для максимальной продукции штаммом антибиотических веществ оптимальным способом культивирования является поверхностное (стационарное), а лучшим экстрагентом из культуральной жидкости – этилацетат.

В дальнейшем была разработана схема разделения антибиотического комплекса этилацетатного и бутанольного экстрактов культуральной

**Таблица 3.** Зоны подавления роста тест-культур штаммом *P. vulpinum* КПБ F-290 при поверхностном и глубинном культивировании

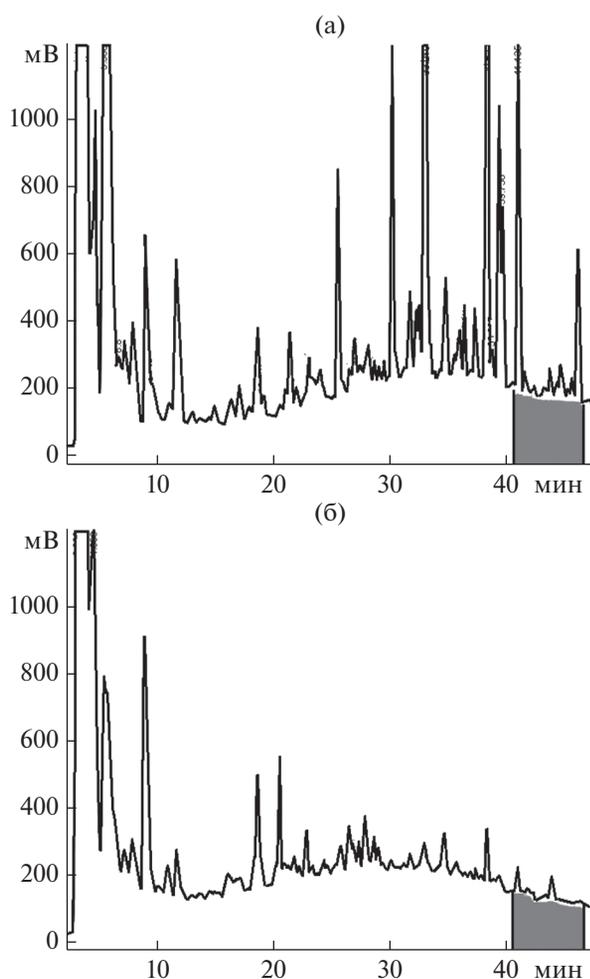
Способ культивирования <i>P. vulpinum</i> КПБ F-290	Зоны подавления роста тест-культур этилацетатными/бутанольными экстрактами (10 мг/диск), мм			
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. niger</i> INA 00760	<i>C. albicans</i> ATCC 2091
Поверхностное	31/25	15/19	11/0	14/13
Глубинное	18/19	11/11	0/0	12с/12

жидкости штамма *Penicillium vulpinum* КПБ F-290 после поверхностного культивирования методом аналитической ОФ-ВЭЖХ, в результате которой удалось получить около 40 отдельных фракций (рис. 1). Масштабирование наработки компонентов штамма *P. vulpinum* КПБ F-290 осуществляли

при оптимальной нагрузке по суммарному веществу и в условиях оптимизированного градиента.

У этилацетатного экстракта наибольшая антимикробная активность была характерна для четырех фракций (290Э-32, 290Э-36, 290Э-37 и 290Э-39), которые элюировались с колонки в диапазоне 41–47 мин (рис. 1а). При этом отдельно было проверено наличие ингибирующих свойств суммарной несвязавшейся с неподвижной фазой фракции (“провала”) (290Э-1). Фракции 290Э-1 и 290Э-39 ингибировали рост *B. subtilis* ATCC 6633 и *Candida albicans* ATCC 2091, величина зон подавления варьировалась в пределах  $30/17 \pm 0.1$  мм и  $29/23 \pm 0.2$  мм соответственно. Фракции 290Э-32, 290Э-36 и 290Э-37 обладали антифунгальной активностью в отношении *A. niger* INA 00760, величина их зон подавления роста была в пределах  $15/22/27 \pm 0.2$  мм соответственно. Фракция 1 характеризовалась относительно полярными свойствами и была отнесена к  $\beta$ -лактамам антибиотикам (в частности, пенициллинового ряда), 4 других соединения обладали более выраженными гидрофобными свойствами.

У бутанольного экстракта наибольшая антимикробная активность была отмечена также для гидрофобных фракций 290Б-25, 290Б-26 и 290Б-29, которые также элюировались в том же временном диапазоне, что и активные компоненты 290Э (рис. 1б). Все индивидуальные соединения обладали антигрибной активностью в отношении *A. niger* INA 00760 и *C. albicans* ATCC 2091, при этом фракция 290Б-26 также обладала антибактериальной активностью в отношении *E. coli* ATCC 25922, а 290Б-29 фракция – антибактериальной активностью в отношении *B. subtilis* ATCC 6633. Стоит отметить, что этилацетат оказался более эффективным экстрагентом для соединений культуральной жидкости *P. vulpinum*, чем бутанол: при качественной оценке суммарный выход растворенного вещества был значительно выше (рис. 1). При этом, что касается зоны выхода группы активных компонентов, то стоит отметить их частичное совпадение по наличию в каждом из экстрактов. Так, фракция 290Э-39 по времени удерживания на колонке соответствовала 290Б-29, что находит свое подтверждение по спектру их антимикробных свойств.



**Рис. 1.** Фракционирование экстракта *P. vulpinum* КПБ F-290 методом аналитической ОФ-ВЭЖХ: а – профиль этилацетатного экстракта штамма *P. vulpinum* КПБ F-290; б – профиль бутанольного экстракта штамма *P. vulpinum* КПБ F-290. Серым выделены фракции, обладавшие ингибирующей рост тест-штаммов активностью.

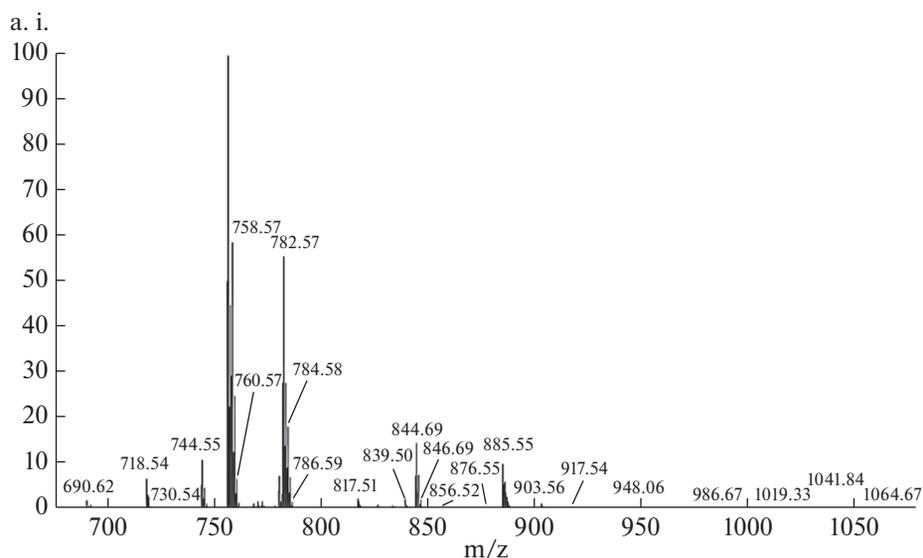


Рис. 2. Масс-спектрометрический анализ активного соединения 290Б-29 (290Э-39).

На грибы минимальная подавляющая концентрация (МПК) фракций в отношении *A. niger* INA 00760 составляла от 6.25 до 12.5 мкг/мл. В отношении *C. albicans* ATCC 2091 МПК варьировалась от 3.125 до 6.25 мкл/мл. На бактерии МПК в отношении *B. subtilis* ATCC 6633 равнялась 25 мкг/мл, а в отношении *E. coli* ATCC 2592 около 100 мкг/мл.

Для дальнейшей структурной характеристики была выбрана фракция 290Э-39 (290Б-29) ввиду ее наибольшего выхода по сравнению с остальными. Так, в результате ее анализа методом ESI-MS был получен тотальный масс-спектр с рядом преобладающих сигналов  $m/z$  в режиме  $[M + H]$  (756.57, 782.57, 844.69 и 885.55 Да), а также некоторых минорных (718.54 и 744.56 Да). По каждому из детектированных значений  $m/z$  показано наличие характерного изотопного распределения; также между соответствующими значениями  $m/z$  не по-

казано наличие различий в массах, которые соответствовали какой-либо стандартной модификации (например, метильной или гидроксильной группы). Следовательно полученные значения могут соответствовать спектру фрагментации метаболита с массой  $[M + H]$  844.69 Да с вероятным производным  $[M + H]$  885.55 Да (рис. 2).

С целью выявления наличия свободных аминогрупп в исследуемой молекуле, которые, в частности, могли бы указать на его возможную пептидную природу, была проведена реакция модификации нативного соединения 290Э-39 (290Б-29) органическим флуорофором активированным эфиром Coumatin 343 X с последующей детекцией продуктов реакции аналитической ОФ-ВЭЖХ. Характер изменения хроматографической подвижности детектируемых пиков позволяет сделать вывод о наличии по крайней мере одной производной (данные не представлены). Кроме того, спектр поглощения исследуемого соединения показал близкий к типовому для большинства ген-кодируемых полипептидов профилю с характерными значениями минимумов и максимумов поглощения, соответственно, при длинах волн менее 230 нм, и диапазоне 260–280 нм (рис. 3).

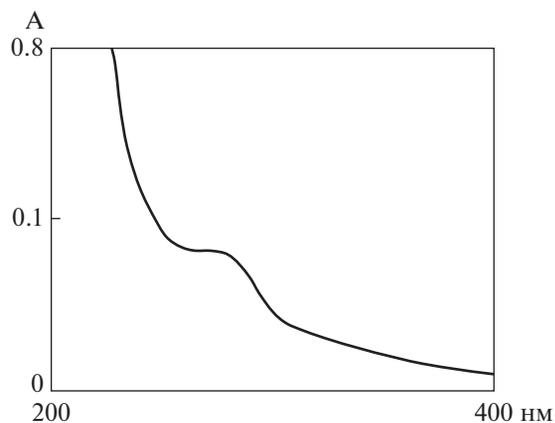


Рис. 3. Спектрофотометрический анализ соединения 290Б-29 (290Э-39).

Таким образом, в результате исследований был отобран психотолерантный штамм *P. vulpinum* КПБ F-290, изучен комплекс его вторичных метаболитов, обладающих антимикробной активностью. В состав несвязавшейся с колонкой при ОФ-ВЭЖХ анализе суммарной фракции с высокой степенью вероятности входят представители  $\beta$ -лактамовых антибиотиков, кроме того, был выделен новый активный полипептид, обладающий антимикробным действием в отношении грамположительных бактерий, в том числе фитопатогенных пектобактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научнотехнической программы развития генетических технологий на 2019–2027 годы (соглашение № 075-15-2021-1345, Уникальный идентификатор проекта RF----193021X0012).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bull A.T. Extremophiles Handbook.* / Ed. K. Horikoshi. Springer, Tokyo, 2011. P. 1204–1240. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>
2. *Bull A.T., Googfellow M.* // *Microbiology.* 2019. V. 165. № 12. P. 1252–1264. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000822>
3. *Bull A.T. Extremophiles Handbook.* / Ed. K. Horikoshi. Springer, Tokyo, 2011. P. 3–15. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-53898-1>
4. *De Maayer P., Anderson D., Cary C., Cowan D.A.* // *EMBO Rep.* 2014. V.15. № 5. P. 508–517. <https://doi.org/10.1002/embr.201338170>
5. *Schmitt E.K., Hoepfner D., Krastel P.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 43. № 2. P. 249–260.
6. *Butler M.S., Blaskovich M.A., Cooper M.A.* // *J. Antibiot.* 2017. V. 70. № 1. P. 3–24.
7. *Imhoff J.F.* // *Marine Drugs.* 2016. V. 14. № 1. P. 19–37.
8. *Arenz B.E., Held B.W., Jurgens J.A., Farrell R.L., Blanchette R.A.* // *Soil Biol. Biochem.* 2006. V. 38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.016>
9. *Shevchenko M., Sukhikh S., Babich O., Noskova S., Ivanova S., Lisun V. et al.* // *Microorganisms.* 2021. V. 9. № 1521. P. 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071521>
10. *Madronich S., McKenzie R.L., Bjorn L.O., Caldwell M.M.* // *J. Photochem. Photobiol.* 1998. V. 46. P. 5–19. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(98\)00182-1](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(98)00182-1)
11. *Montiel P.O.* // *Cryo. Lett.* 2000. V. 21. P. 83–90.
12. *Li Y., Wadsö L., Larsson L.* // *J. Appl. Microbiol.* 2009. V. 106. P. 1494–1501. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04110.x>
13. *O'Brien K., Leichenko R., Kelkar U., Venema H., Aandahl G., Tompkins H. et al.* // *Glob. Environ. Change.* 2004. V. 14. P. 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2004.01.001>
14. *Figuerola L., Jiménez C., Rodríguez J., Areche C.* // *J. Nat. Prod.* 2015. V. 78. P. 919–923.
15. *Frisvad J.C., Frank J.M., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Samson R.A.* // *Stud. Mycol.* 2004. V. 50. P. 23–43.
16. *Niu S., Liu D., Hu X., Proksch P., Shao Z., Lin W.* // *J. Nat. Prod.* 2014. V. 77. P. 1021–1030. <https://doi.org/10.1021/np5000457>
17. *Svahn K.S., Chrystanthou E., Olsen B., Bohlin L., Göransson U.* // *Fungal Biol. Biotechnol.* 2015. V. 2. № 1. P. 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40694-014-0011-x>
18. *Vaca I., Chávez, R.* In: *Fungi of Antarctica.* Cham: Springer, 2019. P. 265–283. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18367-7_12)
19. *Ibrar M., Ullah M.W., Manan S., Farooq U., Rafiq M., Hassan F.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. P. 1–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10399-0>
20. *Lin A., Wu G., Gu Q., Z.T., Li D.* // *Arch. Pharm. Res.* 2014. V.37. № 7. P. 839–844.
21. *Sánchez L.A., Gómez F.F., Delgado O.D.* // *Extremophiles.* 2008. V. 13. P. 111–120. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0203-5>
22. *Лысак Л.В., Максимова И.А., Никитин Д.А., Иванова А.Е., Кудинова А.Г., Соина В.С.* // *Вестник Московского университета.* 2018. Т. 73. № 3. С. 132–140.
23. *Никитин Д.А.* // *Микология и фитопатология.* 2021. Т. 55. № 2. С. 79–104. <https://doi.org/10.31857/S0026364821020070>
24. *Никитин Д.А., Марфенина О.Е., Кудинова А.Г., Лысак Л.В., Мезелов Н.С., Долгих А.В. и др.* // *Почвоведение.* 2017. № 9. С. 1122–1133. <https://doi.org/10.1134/S1064229317070079>
25. *Никитин Д.А., Семенов М.В.* // *Микробиология.* 2022. Т. 91. № 1. С. 1–13. <https://doi.org/10.31857/S0026365622010098>
26. *Sykhikh S.A., Babich O.O., Dyshlyuk L.S., Bulgakova O.M.* // *Characteristics of Microbial Communities of Lake Baikal. International Scientific Review of the Problems of Natural Sciences and Medicine. Collection of Scientific Articles X International Correspondence Scientific Specialized Conference. USA, Boston.* 2019. P. 49–55.
27. *Glushakova A.M., Kachalkin A.V., Chernov I.Y.* // *Eurasian Soil Science.* 2011. V. 44. № 8. P. 886–892. <https://doi.org/10.1134/S1064229311080059>
28. *Егоров Н. С.* Основы учения об антибиотиках. 6-е изд М.: Изд-во МГУ, Наука, 2004. 528 с.
29. *Tan Z.T., Leow H.Y., Lee D.C.W., Karisnan K., Song A.A.L., Mai C.W. et al.* // *The Open Biotechnology J.* 2019. V.13. P. 18–26. <https://doi.org/10.2174/1874070701913010018>
30. *Zheng L., Zhao H., Han Y., Qian H., Vukovic L., Mecinović J. et al.* // *Nat. Chem.* 2019. V. 11. № 4. P. 359–366. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0204-7>
31. *Efimenko T.A., Glukhova A.A., Demiankova M.V., Boykova Y.V., Malkina N.D., Sumarukova I.G. et al.* // *Life (Basel).* 2020. V. 10. № 91. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/life10060091>
32. *Никитин Д.А., Лысак Л.В., Кутювая О.В., Грачева Т.А.* // *Почвоведение.* 2021. № 11. С. 1346–1362. <https://doi.org/10.31857/S0032180X21110101>
33. *Никитин Д.А., Семенов М.В., Семиколенных А.А., Максимова И.А., Качалкин А.В., Иванова А.Е.* // *Микология и фитопатология.* 2019. Т. 53. № 4. С. 210–222.
34. *Bérdy J.* // *J. Antibiot.* 2005. V. 58. № 1. P. 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
35. *Bell T.H., Callender K.L., Whyte L.G., Greer C.W.* // *Biology.* 2013. V. 2. № 2. P. 533–554. <https://doi.org/10.3390/biology2020533>
36. *Convey P., Chown S.L., Clarke A., Barnes D.K.A., Bokhorst S., Cummings V. et al.* // *Ecol. Monogr.* 2014. V. 84. P. 203–244. <https://doi.org/10.1890/12-2216.1>
37. *Davey M., Pickup J., Block W.* // *Antarct. Sci.* 1992. V. 4. P. 383–388.
38. *Peck L.S., Convey P., Barnes D.K.A.* // *Biol. Rev.* 2006. V. 81. P. 75–109. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006871>

## Antimicrobial Properties and Effect of Temperature on the Formation of Secondary Metabolites in Psychrophilic Micromycetes

A. E. Kuvarina<sup>a, \*\*</sup>, Yu. A. Roshka<sup>a</sup>, E. A. Rogozhin<sup>a, b</sup>, D. A. Nikitin<sup>c</sup>,  
A. V. Kurakov<sup>d</sup>, and V. S. Sadykova<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

<sup>b</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

<sup>c</sup> V.V. Dokuchaev Soil Science Institute, Moscow, 119017 Russia

<sup>d</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: sadykova\_09@mail.ru

\*\*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

The ability of representatives of psychrotolerant micromycetes to produce antimicrobial compounds was investigated. As a result of the screening, a promising producer of *Penicillium vulpinum* antibiotics KPB F-290 was selected. The producer exhibited both antifungal and antibacterial activity against opportunistic fungi and bacteria. The isolated active fractions, according to the totality of the revealed data, can be attributed to the group of antimicrobial compounds, including  $\beta$ -lactam antibiotics.

*Keywords:* antimicrobial compounds, psychrophiles, psychrotolerant micromycetes, antibiotics

УДК 577.151;579.66

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ СИНТЕЗА ЦЕФАМАНДОЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО АЦИЛИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМОГО ИММОБИЛИЗОВАННОЙ СИНТЕТАЗОЙ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ-КИСЛОТ

© 2022 г. А. В. Скляренко<sup>1</sup>, \*, И. А. Groшкова<sup>1</sup>, И. Н. Крестьянова<sup>1</sup>, С. В. Яроцкий<sup>1</sup><sup>1</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”  
(НИЦ – “Курчатовский институт”), Москва, 123182 Россия

\*e-mail: asklyarenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.08.2021 г.

После доработки 04.10.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Оптимизированы процессы биокаталитического ацилирования 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразол-7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-ТМСА) и 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-АСА) метиловым эфиром манделовой кислоты (МЕМА) с использованием иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот. В оптимизированных условиях в водно-органической среде, содержащей 43% (об./об.) этиленгликоля, при 30°C в спонтанно устанавливаемом градиенте pH в диапазоне 8.0–6.0 достигнуты выходы биокаталитической трансформации  $80.8 \pm 1.9\%$  при ацилировании 7-ТМСА (концентрация 100–120 мМ) с образованием цефамандола (CFM) и  $88.6 \pm 2.0\%$  при ацилировании 7-АСА (концентрация 140–170 мМ) с образованием полупродукта синтеза CFM (S-p CFM). Различия в исходных концентрациях 7-ТМСА и 7-АСА определяются различиями в растворимости этих субстратов. С учетом несомненных экологических преимуществ процесса химической трансформации полупродукта S-p CFM в CFM перед процессом получения 7-ТМСА из 7-АСА сделан вывод о предпочтительности химико-биокаталитического синтеза CFM по второму пути.

**Ключевые слова:** цефамандол, биокаталитический синтез, синтетаза цефалоспоринов-кислот, синтез с ацильным переносом, 7-аминоцефалоспоровая кислота, растворимость ключевых аминокислот

DOI: 10.31857/S0555109922030126

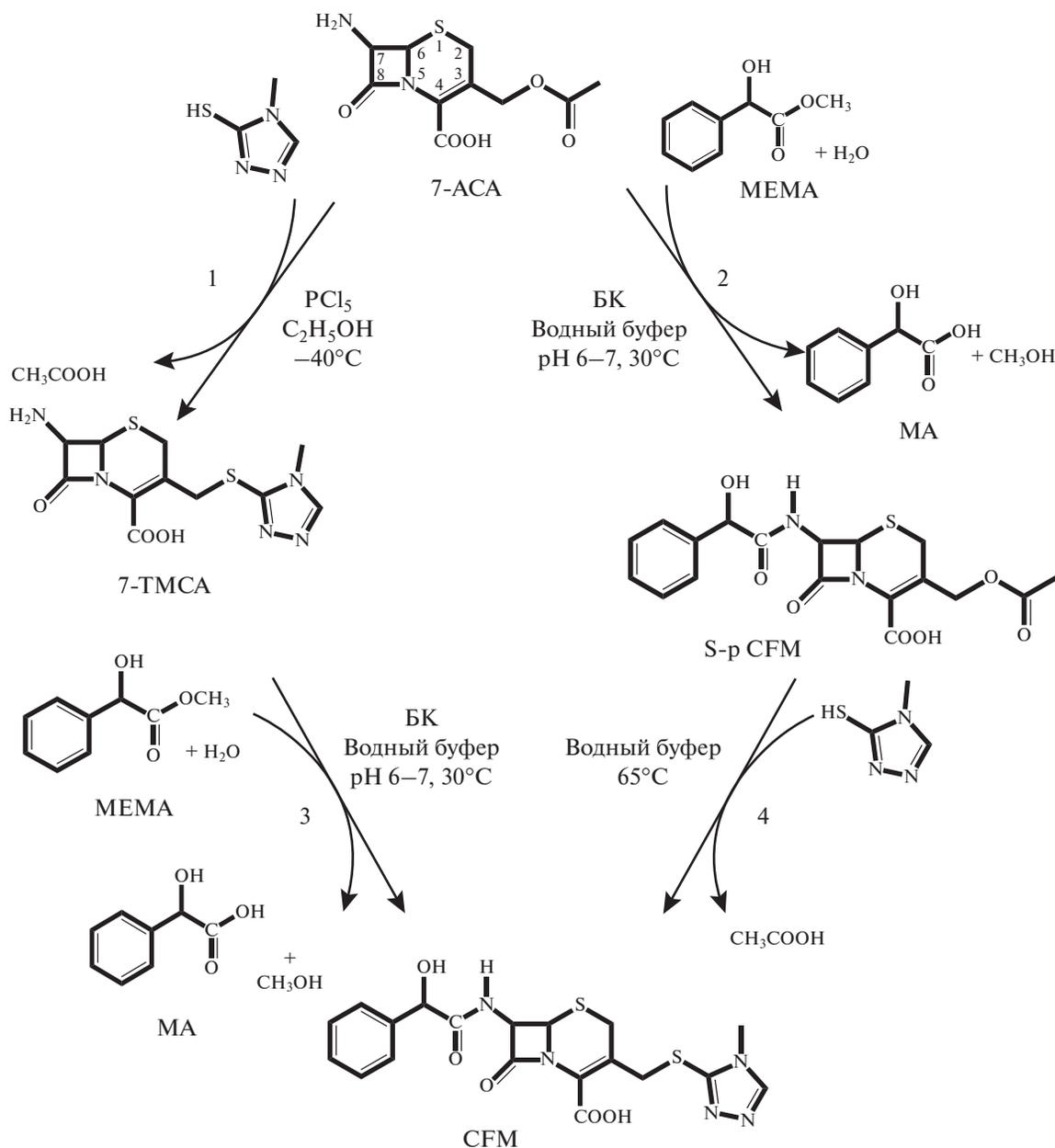
Цефамандол (CFM) – парентеральный цефалоспориновый антибиотик второго поколения, обладающий широким спектром действия и характеризующийся высокой устойчивостью к действию плазмидных  $\beta$ -лактамаз, в том числе стафилококковых пенициллиназ [1]. К достоинствам CFM можно отнести его высокую эффективность при инфекциях, вызванных гемифильной палочкой, а также возможность сочетания данного цефалоспоринона с пенициллинами и аминогликозидами.

Биокаталитический синтез полусинтетических  $\beta$ -лактамов антибиотиков – перспективное направление в области органического синтеза, альтернатива химическому синтезу в производстве лекарственных препаратов. Биокаталитический синтез  $\beta$ -лактамов является предметом многочисленных исследований [2–5], поскольку позволяет избежать использования токсичных реагентов, больших объемов органических раство-

рителей, низких температур реакций, а также очистки промежуточных продуктов при многоступенчатом процессе химического синтеза  $\beta$ -лактамов антибиотиков. Таким образом, применение биокаталитической трансформации для получения  $\beta$ -лактамов антибиотиков безусловно может снизить нагрузку на окружающую среду и уменьшить затраты на производство [6, 7].

Для биокаталитических процессов трансформации органических соединений используют ферменты не в растворенном виде, а в виде гетерогенных биокатализаторов (БК) – иммобилизованных (связанных с твердыми носителями) ферментов. Благодаря высокой специфичности фермента удается получать целевые продукты высокой степени чистоты [8–10].

Ранее в работе [11] по сопоставлению эффективности двух химико-биокаталитических путей синтеза антибиотика цефазолина (CEZ) был изучен и оптимизирован его биокаталитический



**Рис. 1.** Пути химико-биокаталитического синтеза CFM. 1 – химический синтез 7-TMCA из 7-ACA; 2 – биокаталитический синтез CFM из 7-TMCA; 3 – биокаталитический синтез S-p CFM из 7-ACA; 4 – химический синтез CFM из S-p CFM.

синтез путем ацилирования 3-[(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил]-7-аминоцефалоспоровановой кислоты (TDA), а также синтез полупродукта CEZ (S-p CEZ) путем ацилирования 7-аминоцефалоспоровановой кислоты (7-ACA). На основании полученных результатов был сделан вывод о предпочтительности использования биокаталитического ацилирования 7-ACA для разработки химико-биокаталитической технологии получения CEZ.

Настоящая работа посвящена сопоставлению двух биокаталитических путей синтеза другого

$\beta$ -лактамного антибиотика – цефамандола. CFM может быть синтезирован двумя химико-биокаталитическими путями, показанными на рис. 1. Традиционный химико-биокаталитический подход к синтезу CFM основан на том, что сначала химическим методом вводят необходимый заместитель в С3-положение 7-ACA (рис. 1, трансформация 1), а затем осуществляют биокаталитическое ацилирование аминогруппы полученного производного 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспоровановой кислоты (7-TMCA) с образованием CFM (рис. 1, трансформация 2).

Альтернативным химико-биокаталитическим подходом является использование биокатализа для ацилирования аминогруппы в С7-положении 7-АСА (рис. 1, трансформация 3) с последующим химическим превращением полупродукта CFM (S-р CFM) в целевой антибиотик (рис. 1, трансформация 4).

Биокаталитический синтез CFM и S-р CFM проводили методом ацильного переноса (кинетически-контролируемого синтеза) [6, 10, 11], используя 7-ТМСА и 7-АСА в качестве ключевых аминокислот (КА) и метиловый эфир манделовой кислоты (МЕМА) в качестве ацилирующего агента (АА). В качестве биокатализатора использовали иммобилизованную синтетазу цефалоспоринов-кислот (IECASA). Фермент катализирует три конкурентные реакции: синтез CFM или S-р CFM и две побочные гидролитические реакции, а именно, гидролиз ацилирующего агента МЕМА и расщепление ациламидной связи целевого продукта с образованием побочного продукта – манделовой кислоты (МА). Выход β-лактамного антибиотика кинетически контролируется, поскольку он зависит от скорости всех протекающих реакций.

Высокоспецифичным к цефалоспорином-кислотам является фермент синтетазы цефалоспоринов-кислот (Cephalosporin-acid synthetase, CASA КФ 3.5.1.11) [6, 12]. Было установлено [12], что CASA кодируется геном, который является гомологом гена широко специфичной пенициллинацилазы (ПА) из *Escherichia coli*. В настоящей работе в качестве БК был использован фермент CASA, продуцируемый рекомбинантным штаммом *E. coli* ВКПМ В-12316 и иммобилизованный путем ковалентного связывания с эпокси-активированным макропористым носителем [5].

Цель работы – оптимизация ключевых стадий двух химико-биокаталитических путей получения CFM, а именно, процессов биокаталитического ацилирования 7-ТМСА с образованием CFM и 7-АСА с образованием полупродукта S-р CFM, катализируемых IECASA. В качестве критериев оптимизации использовали выход целевого продукта биокаталитической трансформации по отношению к КА и достигаемую концентрацию β-лактамного продукта в конечной реакционной смеси. Оптимизацию осуществляли по таким параметрам, как начальная концентрация КА и состав реакционной среды, а именно, концентрация в ней смешивающегося с водой двухатомного спирта этиленгликоля (ЭГ).

## МЕТОДИКА

**Материалы.** В работе использованы коммерческие образцы 7-АСА фирмы “Anhui BBVA Pharmaceutical Co., LTD” (Китай) 93%-ной чистоты, определенной методом ВЭЖХ; 7-ТМСА, “Shan-

dong Sihuan Pharmaceutical Co., Ltd.” (Китай) 96.5%-ной чистоты, также определенной методом ВЭЖХ; МЕМА (“Sigma-Aldrich”, США) – чистота 99%, определена методом ВЭЖХ; цефамандол натриевая соль (“Sigma-Aldrich”, США) – чистота 99% (по ВЭЖХ); МА (“Sigma-Aldrich”, США) – чистота 99%, (по ВЭЖХ); ЭГ (“РеоХим-Лаб”, Россия) – ГОСТ 19770–83, 99.9%, концентрат. Лабораторный образец стандарта S-р CFM (97% чистоты, определено методом ВЭЖХ) любезно предоставлен Сычуаньским промышленным институтом антибиотиков (Китай).

**Получение биокатализатора IECASA.** Биокатализатор IECASA получали согласно методике, описанной в работах [5, 11], путем иммобилизации фермента CASA из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12316 на макропористом эпокси-активированном носителе Seplite LX-1000EP (“Sunresin New Materials”, Китай). Для работы был получен образец IECASA с синтетазной активностью 340 МЕ/г влажного БК при содержании сухих веществ 37%.

Синтетазную активность образца гетерогенного биокатализатора IECASA определяли по начальной скорости реакции синтеза CEZ из TDA и метилового эфира 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (METzAA) с контролем содержания CEZ в реакционной смеси методом ВЭЖХ.

За 1 международную единицу (МЕ) синтетазной активности образца в реакции синтеза CEZ принимали такое количество препарата, которое катализирует образование 1 мкмоль CEZ за 1 мин в растворе, содержащем 60 мМ TDA и 240 мМ METzAA при температуре 30°C и начальном значении pH 7.5 [5, 11].

**Анализ методом ВЭЖХ.** Анализ реакционных смесей, получаемых при биокаталитическом синтезе CFM и S-р CFM, а также смесей, получаемых при изучении растворимости субстратов, проводили методом ВЭЖХ в изократическом режиме на хроматографе фирмы “Gilson” (США) с использованием хроматографической колонки “Spherisorb ODS”, 250 × 4 мм с диаметром частиц 7.5 мкм. В качестве мобильной фазы использовали смесь, состоящую из 0.05 М фосфатно-аммонийного буфера, pH 4.0, и метанола в различных соотношениях в зависимости от изучаемого процесса (табл. 1). Скорость потока мобильной фазы – 1.0 мл/мин. Детектирование пиков анализируемых веществ осуществляли спектрофотометрически при длине волны 218 или 254 нм. Условия проведения анализа методом ВЭЖХ и времена удерживания анализируемых веществ (RT) представлены в табл. 1.

**Проведение синтеза CFM и S-р CFM, катализируемого IECASA.** Биокаталитический синтез CFM и S-р CFM осуществляли путем ацилирования соответствующей КА (7-ТМСА или 7-АСА) метиловым эфиром манделовой кислоты. Для проведе-

**Таблица 1.** Условия проведения анализа методом ВЭЖХ

Процесс	Определяемый компонент	Содержание метанола в мобильной фазе, % (об./об.)	Детекция, нм	RT, мин
Биокаталитический синтез S-p CFM	7-ACA	1	218	7.8–8.0
	МА			5.3–5.8
	S-p CFM	35		4.1–4.5
	МЕМА			6.8–7.3
Биокаталитический синтез CFM	7-ТМСА	5	218	11.6–12.0
	МА			4.5–4.7
	МЕМА	35		7.0–7.3
	CFM			4.5–5.5
Определение растворимости 7-ACA	7-ACA	5	254	2.8–5.0
Определение растворимости 7-ТМСА	7-ТМСА	8	254	8.0–8.3
Определение растворимости МЕМА	МЕМА	35	218	7.0–7.3

ния процесса синтеза использовали стеклянный реактор емкостью 75 мл, оборудованный лопастной механической мешалкой и снабженный системами поддержания температуры и pH. Для приготовления раствора субстратов в реакторе при температуре  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  суспендировали навеску КА в 0.3 М фосфатно-натриевом буфере (ФБ), pH 8.3, с добавлением или без добавления ЭГ. Растворение КА осуществляли под контролем pH при постоянном перемешивании и порционном добавлении 2 М NaOH вплоть до полного растворения КА. При этом pH не превышал величину 8.0. После растворения КА вносили навеску МЕМА. Раствор перемешивали в течение 3–5 мин до полного или частичного растворения АА и начинали процесс биокаталитического синтеза, добавляя навеску IECASA, необходимую для создания в реакционной смеси требуемого содержания активного фермента ( $C_E = 10\text{--}30$  ME/мл). Значение pH снижалось по ходу реакции за счет образования МА. Процесс синтеза CFM или S-p CFM проводили при постоянном умеренном перемешивании реакционной смеси, температуре ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) в спонтанно устанавливаемом градиенте pH. После достижения значения pH, равного 6.0, его поддерживали добавлением 2.0 М NaOH. Синтез останавливали, отделяя IECASA вакуумной фильтрацией на пористом стеклянном фильтре.

Для исследования динамики процесса синтеза каждые 5–10 мин отбирали пробу реакционной смеси и контролировали в ней методом ВЭЖХ содержание четырех компонентов: КА (7-ТМСА или 7-ACA), ацилирующего агента МЕМА, целевого  $\beta$ -лактамого продукта (CFM или S-p CFM) и побочного продукта МА. Синтез проводили до

достижения стабильного плато на кривой зависимости относительной концентрации целевого продукта от времени (плато максимальной концентрации целевого продукта,  $C_{\text{прод}}^{\text{макс}}$ , мМ). Относительное содержание целевого продукта (CFM или S-p CFM) в текущий момент времени рассчитывали по отношению к содержанию в реакционной смеси КА (7-ТМСА или 7-ACA) в начальный момент времени ( $C_{\text{КА}}^0$ , мМ). Максимальную степень трансформации КА в целевой продукт (максимальный выход целевого продукта,  $\eta^{\text{макс}}$ , %) рассчитывали по формуле:

$$\eta^{\text{макс}} = \frac{C_{\text{прод}}^{\text{макс}}}{C_{\text{КА}}^0} \times 100$$

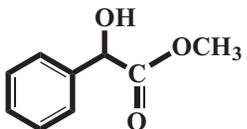
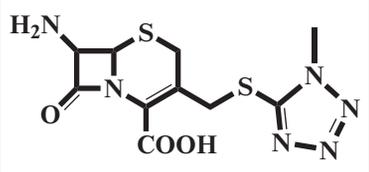
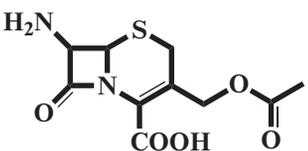
(средние данные на плато).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Растворимость субстратов биокаталитического синтеза CFM и S-p CFM.** Учет растворимости КА и АА является важным инструментом для выбора оптимальных условий процессов биокаталитического синтеза  $\beta$ -лактамов [14]. Растворимость 7-ТМСА, 7-ACA и МЕМА изучали в условиях, моделирующих условия проведения биокаталитических процессов, а именно:  $30^\circ\text{C}$ , 0.3 М ФБ, начальная концентрация ЭГ ( $C_{\text{ЭГ}}$ , % об./об.) – 0 или 43%. Эксперименты проводили методом насыщения, описанным в работах [5, 14, 16]. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Не зависящая от pH растворимость МЕМА, не являющегося электролитом, была изучена при pH 6.5, что обеспечило практическое отсутствие

**Таблица 2.** Влияние этиленгликоля на кислотно-основные свойства и растворимость субстратов биокаталитического синтеза CFM и S-p CFM

Соединение	Структура	Электрохимическая природа	Константы ионизации		Характеристическая растворимость, мМ*	Концентрация этиленгликоля $C_{ЭГ}$ , % (об./об.)
			$pK_1$	$pK_2$		
МЕМА		Неэлектролит	–	–	$134 \pm 4$	0
					$360 \pm 11$	43
7-ТМСА		Электролит, аминокислота	$2.16 \pm 0.03$	$4.71 \pm 0.05$	$0.22 \pm 0.03$	0
			$2.33 \pm 0.03$	$4.72 \pm 0.05$	$0.15 \pm 0.03$	43
7-АСА		Электролит, аминокислота	$1.73 \pm 0.02$	$4.70 \pm 0.05$ [11]	$2.78 \pm 0.09$	0
			$2.25 \pm 0.03$	$4.58 \pm 0.05$	$1.42 \pm 0.14$	43

\* Характеристическая растворимость электролита – это растворимость его электронейтральной формы, а именно, цвиттерионной формы в случае аминокислоты ( $S^\pm$ ). Растворимость неэлектролита ( $S$ ) не зависит от рН.

спонтанного гидролиза данного эфира в процессе проведения экспериментов. Из табл. 2 видно, что присутствие ЭГ существенно влияло на растворимость МЕМА. Так в водной буферной среде при  $C_{ЭГ} = 0$  % (об./об.) растворимость МЕМА составляла 130 мМ, а при  $C_{ЭГ} = 43$  % (об./об.) она достигала 360 мМ.

Для 7-ТМСА и 7-АСА было изучено влияние рН на растворимость этих аминокислот при слабощелочном, нейтральном и слабощелочном рН и определены константы ионизации карбоксильной ( $pK_2$ ) и аминогруппы ( $pK_1$ ), а также характеристическая растворимость ( $S^\pm$ ).

Для аминокислот 7-ТМСА и 7-АСА зависимость растворимости ( $S$ , мМ) от рН, описывается уравнением:

$$S = S^\pm \frac{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2}{K_1[H^+]}. \quad (1)$$

При нейтральных и щелочных рН в условиях полного депротонирования карбоксильной группы аминокислоты может быть использовано уравнение:

$$S = S^\pm + S^\pm K_2 \frac{1}{[H^+]}. \quad (1.1)$$

При кислых рН в условиях полного протонирования аминогруппы аминокислоты применимо уравнение:

$$S = S^\pm + \frac{S^\pm}{K_1}[H^+], \quad (1.2)$$

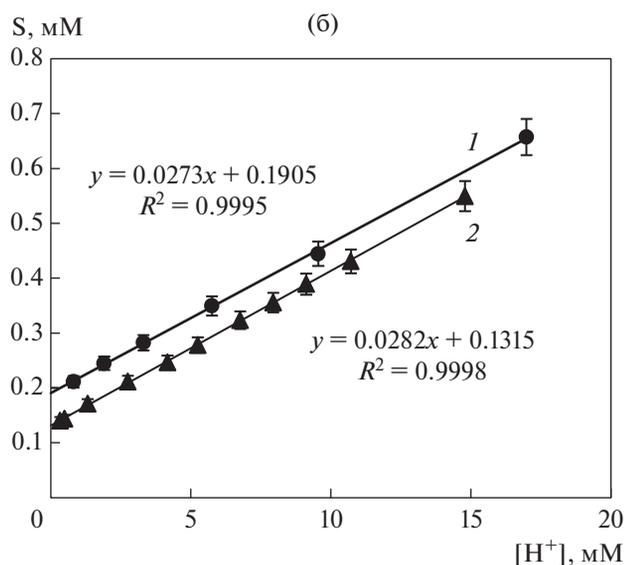
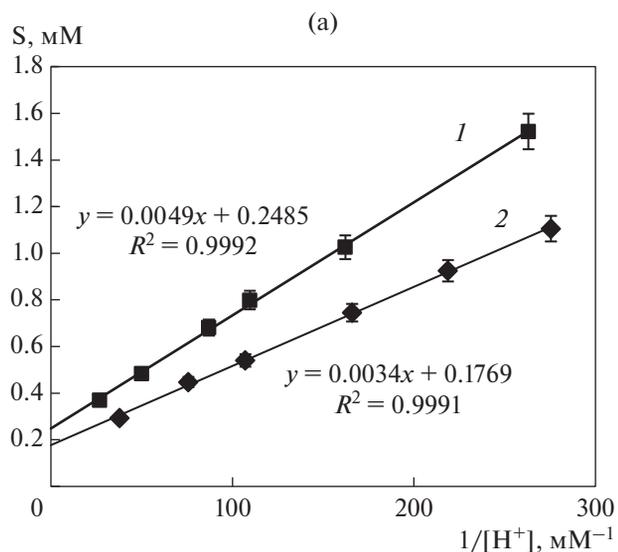
где  $[H^+]$  – концентрация ионов водорода в растворе при заданном рН, мМ;

$K_2$  – константа ионизации карбоксильной группы аминокислоты, мМ;

$K_1$  – константа ионизации аминогруппы аминокислоты, мМ;

$S^\pm$  – растворимость индивидуальной электронейтральной цвиттерионной формы аминокислоты (характеристическая растворимость электролита), мМ.

На рис. 2а и 3а представлена линейаризация экспериментальных данных в координатах уравнения (1.1,  $S$  vs.  $1/[H^+]$ ), полученных при изучении влияния рН на растворимость аминокислот 7-ТМСА и 7-АСА при нейтральном и слабощелочном рН при  $C_{ЭГ} = 0$  % (об./об.) и  $C_{ЭГ} = 43$  % (об./об.) соответственно. Линейаризация в координатах уравнения (1.2,  $S$  vs.  $[H^+]$ ) экспериментальных данных, полученных при изучении влияния рН на растворимость аминокислот при нейтральном и слабощелочном рН при  $C_{ЭГ} = 0$  % (об./об.) и  $C_{ЭГ} = 43$  %

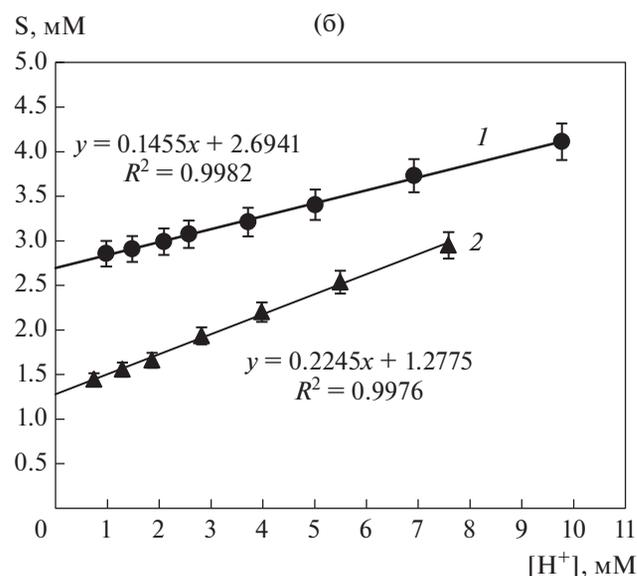
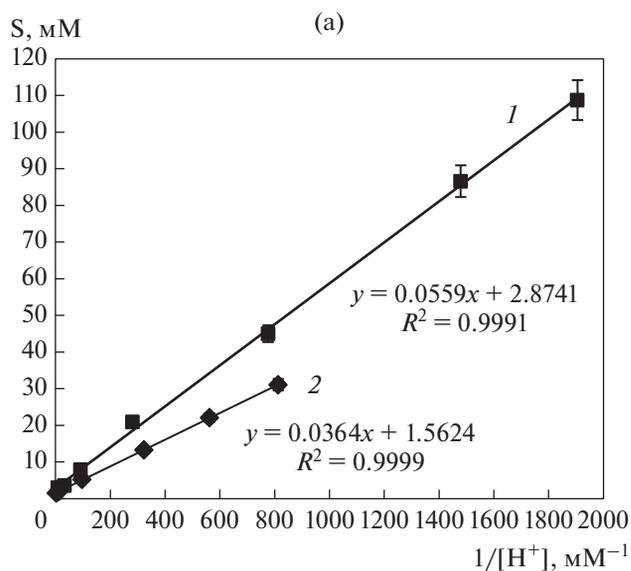


**Рис. 2.** Зависимости растворимости 7-ТМСА от рН в 0.3 М ФБ при 30°C: а – в координатах уравнения (1.1), б – в координатах уравнения (1.2). 1 –  $C_{ЭГ} = 0\%$  (об./об.); 2 –  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.).

(об./об.), представлена на рис. 26 и 36 соответственно.

Расчитанные значения констант ионизации и характеристической растворимости для 7-ТМСА и 7-АСА приведены в табл. 2. На величину  $pK_2$  7-ТМСА и 7-АСА этиленгликоль практически не влиял, однако увеличивал величину  $pK_1$ , особенно в случае 7-АСА (на 0.5 ед. рН). Для обеих аминокислот в присутствии ЭГ характеристические растворимости снижались: в 1.5 раза для 7-ТМСА и в 2 раза для 7-АСА.

По уравнению (1) с использованием констант, представленных в табл. 2, были рассчитаны теоретические кривые зависимости растворимости



**Рис. 3.** Зависимости растворимости 7-АСА от рН в 0.3 М ФБ при 30°C: а – в координатах уравнения (1.1), б – в координатах уравнения (1.2). 1 –  $C_{ЭГ} = 0\%$  (об./об.); 2 –  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.).

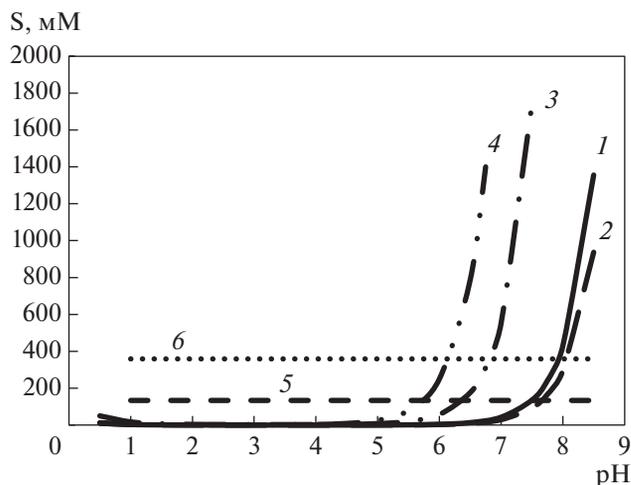
7-ТМСА и 7-АСА от рН при  $C_{ЭГ} = 0\%$  (об./об.) и  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.) (кривые 1–4 на рис. 4). На рис. 4 представлена также растворимость МЕМА в водной среде (кривая 5) и в присутствии ЭГ (кривая 6).

Влияние ЭГ на растворимость КА различно: растворимость 7-ТМСА в присутствии ЭГ снижалась (кривые 1 и 2, рис. 4), а растворимость 7-АСА существенно увеличивалась (кривые 3 и 4, рис. 4). При этом во всем изученном диапазоне рН растворимость 7-АСА значительно превышала растворимость 7-ТМСА как в водной среде (кривые 3 и 1, рис. 4), так и в присутствии ЭГ (кривые 4 и 2,

рис. 4). В рабочем диапазоне pH 6.0–7.0, где CASA обладает высокой активностью и стабильностью [5], растворимость 7-ТМСА в водной среде изменялась от 4.5 до 43 мМ, а растворимость 7-АСА превышала ее более чем в 10 раз, изменяясь от 55 до 570 мМ (расчет по уравнению (1)). Присутствие в среде ЭГ ( $C_{ЭГ} = 43\%$ , (об./об.)) увеличивало разрыв в растворимости КА в диапазоне pH 6.0–7.0 до 80 раз: растворимость 7-ТМСА изменялась от 3.0 до 30 мМ, а растворимость 7-АСА от 250 до 2500 мМ (расчет по уравнению (1)). В присутствии ЭГ ( $C_{ЭГ} = 43\%$ , (об./об.)) растворимость МЕМА увеличивалась в 2.8 раза по сравнению с водной средой ( $C_{ЭГ} = 0\%$ , (об./об.)) (кривые 6 и 5 на рис. 4, табл. 2). При изучении синтеза CFM для достижения в реакционной смеси исходной концентрации 7-ТМСА, превышающей ее растворимость в рабочем диапазоне pH 6.0–7.0, раствор субстратов готовили при pH около 8.0. В ходе ацилирования 7-ТМСА метиловым эфиром манделовой кислоты pH снижался за счет образования МА, однако 7-ТМСА не выпадала в осадок за счет эффекта перенасыщения, как это описано ранее для TDA при синтезе CEZ в работе [5].

Таким образом, с точки зрения возможности создания в реакционной среде высоких исходных концентраций КА ( $C_{КА}^0$ ) и АА ( $C_{АА}^0$ ), предпочтительным является биокаталитический процесс ацилирования 7-АСА с образованием S-р CFM, протекающий в среде, содержащей ЭГ.

**Оптимизация процессов биокаталитического синтеза CFM и S-р CFM, катализируемого IECASA.** Для повышения выхода целевого  $\beta$ -лактама в процессах синтеза с ацильным переносом может быть использована водно-органическая среда, содержащая смешивающийся с водой двухатомный спирт ЭГ. Наблюдаемый эффект является следствием снижения активности воды в присутствии органических растворителей, влекущей за собой уменьшение скорости непродуктивных гидролитических процессов. При этом замедляется гидролиз как ацилирующего агента, так и целевых продуктов [16, 17]. В ряде работ было продемонстрировано существенное увеличение выхода амино- $\beta$ -лактамов антибиотиков ампициллина [18–20] и цефалексина [21–23] в процессах их кинетически-контролируемого синтеза, катализируемого иммобилизованной различными способами ПА из *E. coli*, за счет присутствия ЭГ в реакционной среде. Было показано, что растворитель не оказывал инактивирующего действия на ПА из *E. coli* [18, 19]. В настоящей работе ЭГ был использован для увеличения выхода CFM и S-р CFM, относящихся к классу  $\beta$ -лактамов-кислот, в процессах их биокаталитического синтеза, катализируемого БК на основе рекомбинантного фермента CASA, гомологичного ПА из *E. coli* [12].



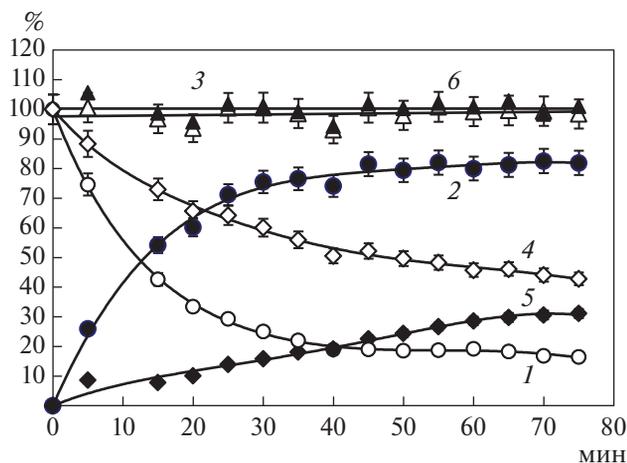
**Рис. 4.** Теоретические кривые зависимости растворимости субстратов от pH, рассчитанные с использованием констант, представленных в табл. 2 (30°C, 0.3 М ФБ). Кривые 1–4 рассчитаны по уравнению (1). 1 – 7-ТМСА при  $C_{ЭГ} = 0\%$ ; 2 – 7-ТМСА при  $C_{ЭГ} = 43\%$ ; 3 – 7-АСА при  $C_{ЭГ} = 0\%$ ; 4 – 7-АСА при  $C_{ЭГ} = 43\%$ ; 5 – МЕМА при  $C_{ЭГ} = 0\%$ ; 6 – МЕМА при  $C_{ЭГ} = 43\%$ .

Процессы биокаталитического ацилирования 7-ТМСА и 7-АСА метиловым эфиром манделовой кислоты проводили в следующих условиях: 30°C, 0.3 М ФБ,  $X^0 = 3.3$  М/М (мольный избыток

АА над КА,  $X^0 = \frac{C_{АА}^0}{C_{КА}^0}$ ), спонтанный градиент pH

(спонтанное снижение pH от значения, при котором растворяют субстраты, до pH 6.0 и поддержание этого значения pH до завершения процесса). Эти условия были выбраны для биокатализатора IECASA при оптимизации процессов синтеза CEZ и S-р CEZ [5, 11]. В настоящей работе при оптимизации процессов синтеза CFM и S-р CFM варьировали два параметра: начальную концентрацию КА ( $C_{7-ТМСА}^0 = 60–120$  мМ или  $C_{7-АСА}^0 = 60–170$  мМ) и концентрацию ЭГ в реакционной смеси ( $C_{ЭГ} = 0–43\%$ , (об./об.)). Биокатализатор IECASA вносили в количестве, обеспечивающем содержание активного фермента в реакционной смеси  $C_E = 10–30$  МЕ/мл, так, чтобы длительность процесса, включая плато максимальной концентрации продукта, составляла 70–90 мин.

Отметим, что ЭГ тормозит не только побочные процессы гидролиза, протекающие при синтезе с ацильным переносом, но и (в меньшей степени) целевой процесс синтеза [17]. Было показано, что начальная скорость накопления CFM в процессе его биокаталитического синтеза снижалась в два раза при  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.) по сравнению с начальной скоростью процесса в водной среде. Про-

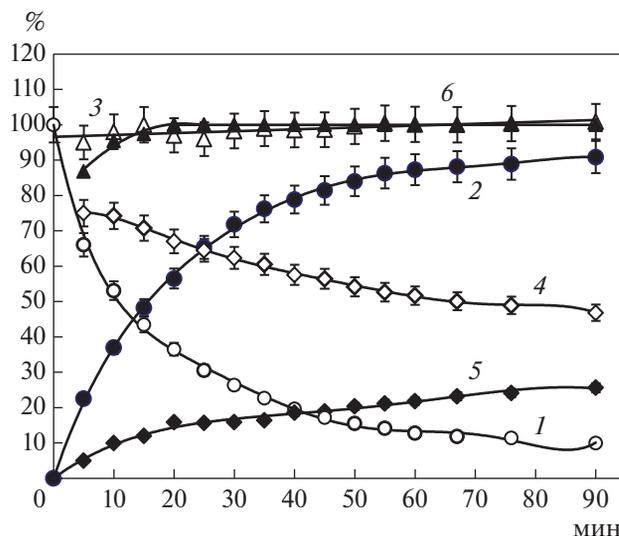


**Рис. 5.** Изменение состава реакционной смеси (относительные концентрации, %) от времени при синтезе CFM, катализируемом IECASA (30°C, 0.3 М ФБ,  $C_E = 30$  МЕ/мл,  $C_{КА}^0 = 120$  мМ,  $C_{АА}^0 = 400$  мМ,  $X^0 = 3.3$  М/М,  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.), спонтанный градиент pH в диапазоне pH 8.0–6.0). 1 – 7-ТМСА; 2 – CFM, рассчитаны по отношению к  $C_{КА}^0$ ; 3 – баланс (%) по  $\beta$ -лактаму, сумма относительных концентраций 7-ТМСА и CFM; 4 – МЕМА, 5 – МА, рассчитаны по отношению к  $C_{АА}^0$ ; 6 – баланс (%) по МА – сумма относительных концентраций CFM, МЕМА и МА.

цессы биокаталитического синтеза CFM и S-p CFM при концентрациях ЭГ более 43% (об./об.) не изучались, так как их осуществление за время, не превышающее 90 мин, требует содержания IECASA в реакционной смеси более 100 мг/мл, что затрудняет массообменные процессы.

В каждом эксперименте по синтезу  $\beta$ -лактама осуществляли динамический контроль состава реакционной смеси по всем компонентам (КА, АА, целевой продукт, МА) и рассчитывали балансы по  $\beta$ -лактаму и МА. Результаты двух экспериментов, проведенных при  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.), показаны на рис. 5 и 6 для биокаталитического ацилирования 7-ТМСА и 7-АСА соответственно, при максимальной использованной концентрации КА для каждого процесса:  $C_{7-ТМСА}^0 = 120$  мМ (рис. 5) и  $C_{7-АСА}^0 = 170$  мМ (рис. 6).

В обоих процессах наблюдалось продолжительное плато на кривых накопления целевого продукта (рис. 5 и 6, кривые 2). Максимальные выходы CFM и S-p CFM, рассчитанные как среднее значение на плато, составили в этих экспериментах  $81.3 \pm 2.2$  и  $88.8 \pm 2.3\%$  соответственно. Особенностью процесса синтеза S-p CFM, результаты которого представлены на рис. 6, было использование АА при начальной концентрации 560 мМ, превышающей растворимость МЕМА.



**Рис. 6.** Изменение состава реакционной смеси (относительные концентрации, %) от времени при синтезе S-p CFM, катализируемом IECASA (30°C, 0.3 М ФБ,  $C_E = 30$  МЕ/мл,  $C_{КА}^0 = 170$  мМ,  $C_{АА}^0 = 560$  мМ,  $X^0 = 3.3$  М/М,  $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.), спонтанный градиент pH в диапазоне pH 8.0–6.0): 1 – 7-АСА; 2 – S-p CFM, рассчитаны по отношению к  $C_{КА}^0$ ; 3 – баланс (%) по  $\beta$ -лактаму, сумма относительных концентраций 7-АСА и S-p CFM; 4 – МЕМА; 5 – МА, рассчитаны по отношению к  $C_{АА}^0$ ; 6 – баланс (%) по МА – сумма относительных концентраций S-p CFM, МЕМА и МА.

Из-за неполного растворения МЕМА в течение первых 15 мин наблюдалось отсутствие баланса не только по МА (рис. 6, кривая 6), но и по  $\beta$ -лактаму (рис. 6, кривая 3). Это можно объяснить тем, что часть 7-АСА также выпадала в осадок в присутствии нерастворенных кристаллов АА. Далее оба баланса достигали 100%, т.е. оба субстрата полностью растворялись, а кроме того, в системе отсутствовали побочные процессы, в том числе с участием  $\beta$ -лактаманного ядра.

На основании результатов всех проведенных экспериментов по синтезу CFM и S-p CFM, катализируемому IECASA, были построены зависимости максимального выхода продукта реакции ( $\eta^{\max}$ , %) от концентрации ЭГ ( $C_{ЭГ}$ , % (об./об.)) и от начальной концентрации КА ( $C_{КА}^0$ , мМ), представленные на рис. 7 и 8 соответственно.

Использование водно-органической среды, содержащей ЭГ, позволило повысить выход CFM (рис. 7, кривая 1) с 60% ( $C_{ЭГ} = 0\%$  (об./об.)) до 70% ( $C_{ЭГ} = 43\%$  (об./об.)). С увеличением концентрации ЭГ от 0 до 43% (об./об.) выход S-p CFM возрос с 80% до 88% (рис. 7, кривая 2).

Для дальнейших исследований процессов биокаталитического синтеза CFM и S-р CFM, катализируемых IECASA, была выбрана водно-органическая среда, содержащая ЭГ в концентрации 43% (об./об.), поскольку она обеспечивала наиболее высокий выход целевых продуктов. Зависимости максимального выхода каждого из процессов ( $\eta^{\text{макс}}$ , %) от начальной концентрации КА ( $C_{\text{КА}}^{\circ}$ , мМ) представлены на рис. 8. Зависимость выхода CFM от  $C_{\text{КА}}^{\circ}$  была исследована в диапазоне 50–120 мМ (рис. 8, кривая 1), поскольку растворимость 7-ТМСА в условиях проведения эксперимента не позволяла достичь в исходной реакционной смеси более высокой концентрации КА, чем 120 мМ. Зависимость выхода S-р CFM от начальной концентрации 7-АСА была исследована в диапазоне  $C_{\text{КА}}^{\circ} = 40$ –170 мМ (рис. 8, кривая 2). Растворимость 7-АСА в условиях проведения эксперимента при  $C_{\text{ЭГ}} = 43\%$  (об./об.), рН 6.0–8.0 очень высока (рис. 4, кривая 4), однако диапазон используемой  $C_{\text{КА}}^{\circ}$  при  $X^{\circ} = 3.3$  М/М ограничен сверху растворимостью МЕМА.

Зависимости выхода продукта от  $C_{\text{КА}}^{\circ}$  имеют вид кривых с насыщением (рис. 8). Выход CFM монотонно возрастал с ростом концентрации 7-ТМСА вплоть до  $C_{\text{КА}}^{\circ} = 100$  мМ и в диапазоне  $C_{\text{КА}}^{\circ}$  от 100–120 мМ достигал среднего значения  $80.8 \pm 1.9\%$ . Наибольший выход продукта процесса синтеза S-р CFM достигался в диапазоне  $C_{\text{КА}}^{\circ}$  от 140–170 мМ и его среднее значение в данном диапазоне составляло  $88.6 \pm 2.0\%$ .

На основании полученных результатов были выбраны следующие оптимальные условия процессов синтеза CFM и S-р CFM, катализируемых IECASA: 30°C, 0.3 М ФБ,  $C_{\text{ЭГ}} = 43\%$  (об./об.),  $C_{\text{Е}} = 30$  МЕ/мл, спонтанный градиент рН в диапазоне рН 8.0–6.0,  $X^{\circ} = 3.3$  М/М,  $C_{\text{КА}}^{\circ} = 100$ –120 мМ для процесса ацилирования 7-ТМСА и  $C_{\text{КА}}^{\circ} = 140$ –170 мМ для процесса ацилирования 7-АСА. В таких оптимальных условиях продолжительность процессов ацилирования (время выхода на плато максимальной концентрации продукта) составляла 50 и 60 мин для синтеза CFM и S-р CFM соответственно.

В табл. 3 представлены результаты, достигнутые при синтезе CFM и S-р CFM, катализируемом IECASA, в выбранных оптимальных условиях, обеспечивающих высокую степень трансформации КА в  $\beta$ -лактамы ( $\eta^{\text{макс}}$ , %) и высокую концентрацию целевого продукта в конечной реакционной смеси ( $C_{\text{прод}}^{\text{макс}}$ , мМ), что необходимо для разработки эффективного процесса выделения и очистки антибиотика. Полученные в настоящей

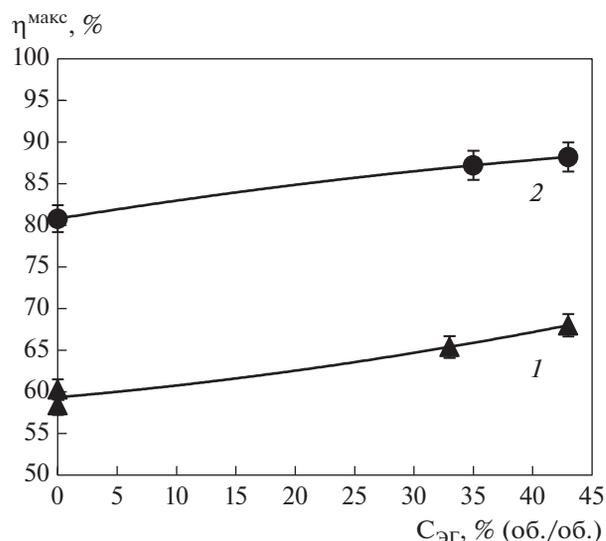


Рис. 7. Зависимость максимального выхода  $\beta$ -лактама от концентрации этиленгликоля ( $C_{\text{ЭГ}}$ , % (об./об.)) в реакционной смеси при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA (30°C, 0.3 М ФБ,  $X^{\circ} = 3.3$  М/М, спонтанный градиент рН): 1 – синтез CFM из 7-ТМСА и МЕМА при  $C_{\text{Е}} = 10$ –20 МЕ/мл;  $C_{\text{КА}}^{\circ} = 60$  мМ; 2 – синтез S-р CFM из 7-АСА и МЕМА при  $C_{\text{Е}} = 30$  МЕ/мл;  $C_{\text{КА}}^{\circ} = 150$  мМ.

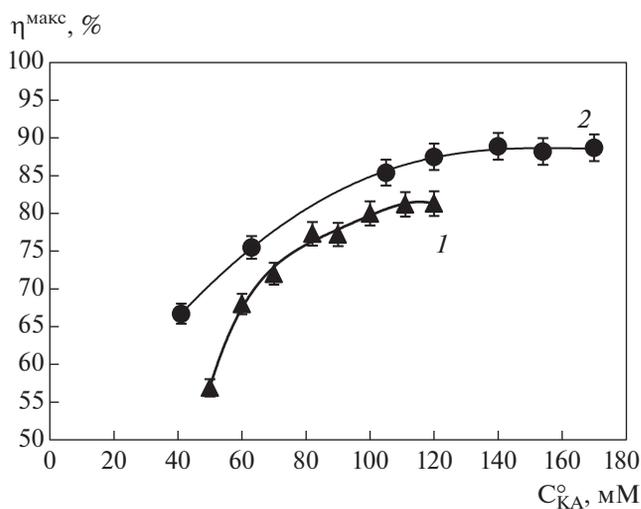


Рис. 8. Зависимость максимального выхода  $\beta$ -лактама от начальной концентрации КА ( $C_{\text{КА}}^{\circ}$ , мМ) при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA (30°C, 0.3 М ФБ,  $X^{\circ} = 3.3$  М/М,  $C_{\text{Е}} = 20$ –30 МЕ/мл, спонтанный градиент рН,  $C_{\text{ЭГ}} = 43\%$  (об./об.)): 1 – синтез CFM из 7-ТМСА и МЕМА; 2 – синтез S-р CFM из 7-АСА и МЕМА.

**Таблица 3.** Параметры эффективности процессов биокаталитического синтеза CFM и S-p CFM

Продукт	Биокатализатор	Условия процесса					Конечная реакционная смесь	
		$C_{КА}^{\circ}$ , мМ	$X^{\circ}$ , М/М	Среда	Температура, °С	Время, мин	$\eta_{\max}^{\circ}$ , %	$C_{\text{прод}}^{\max}$ , мМ
CFM	IECASA	100–120	3.3	Однофазная система: 0.3 М ФБ, ЭГ (43%)	30	50	$80.8 \pm 1.9$	80–100
	ПА из <i>E. coli</i> , на глиоксил-агарозе [21]	50	1.5	Водная двухфазная система: ПЭГ 600 (100%) и 3 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15	90	60.0	30
S-p CFM	IECASA	140–170	3.3	Однофазная система: 0.3 М ФБ, ЭГ (43%)	30	60	$88.6 \pm 2.0$	125–150
	ПА из <i>E. coli</i> , на Sepharose [22]	50	3.0	Водная двухфазная система: ПЭГ 600 (80%) и 4 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	120	88.0	44

работе результаты по кинетически-контролируемому синтезу CFM и S-p CFM, катализируемому IECASA, сопоставлены в табл. 3 с лучшими из имеющихся в литературе результатами по биокаталитическому синтезу этих соединений [24, 25].

Сравнение катализируемых IECASA процессов синтеза CFM из 7-ТМСА, S-p CFM и 7-АСА, (рис. 1, трансформации 2 и 3) свидетельствовало о таких преимуществах второго процесса, как увеличение выхода продукта процесса ацилирования с  $80.8 \pm 1.9$  до  $88.6 \pm 2.0\%$  и увеличение концентрации целевого  $\beta$ -лактама в конце процесса в реакционной смеси в 1.5 раза. Следует отметить, что увеличение концентрации продукта S-p CFM в конечной реакционной смеси по сравнению с концентрацией CFM достигалось как за счет повышения выхода продукта процесса трансформации, так и в результате достижения более высокой начальной концентрации 7-АСА по сравнению с начальной концентрацией 7-ТМСА.

Таким образом, процесс биокаталитического ацилирования 7-АСА метиловым эфиром манделовой кислоты (рис. 1, трансформация 3) протекал более эффективно, чем ацилирование 7-ТМСА (рис. 1, трансформация 2). Существенно, что химическая трансформация S-p CFM в CFM (рис. 1, трансформация 4) может быть осуществлена без выделения S-p CFM из реакционной смеси [11, 25] и с экологической точки зрения предпочтительнее, так как протекает в более мягких условиях, чем химическая трансформация 7-АСА в 7-ТМСА (рис. 1, трансформация 1). В связи с этим химико-биокаталитический синтез CFM через полупродукт S-p CFM представляется более перспективным для разработки конкурентоспособной технологии получения данного антибиотика. Ранее аналогичный вывод был сделан нами при со-

поставлении химико-биокаталитических путей синтеза другого цефалоспоринового антибиотика – CEZ [11].

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 593-00003-19 ПР “Фундаментальные и прикладные научные работы в области биотехнологии”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sharon S.C. // xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Cefamandole. / Ed. S.J. Enna, D.B. Bylund. Elsevier Inc., 2008. P. 1–5.
2. Schmidt F.-R. *The Mycota X. Industrial Applications.* / Ed. K. Esser, M. Hofrichter. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. V. 5. P. 101–121.
3. Srirangan K., Orr V., Akawi L., Westbrook A., Moo-Young M., Chou C.P. // *Biotechnol Adv.* 2013. V. 31. № 8. P. 1319–1332.
4. Volpato G., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. № 32. P. 3855–3873.
5. Wang Lu, Sklyarenko A.V., Li Duanhua, Sidorenko A.I., Zhao Chen, Li Jinjun, Yarotsky S.V. // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2018. V. 41. № 12. P. 1851–1867.
6. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. // *Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development.* / Ed. G.E. Zaikov. N.Y.: Nova Science Publishers, 2008. Ch. 20. P. 175–204.
7. Sheldon R.A., Woodley J.M. // *Chem. Reviews.* 2018. V. 118. № 2. P. 801–838.
8. Rajasekar V.W. // *Enz. Eng.* 2016. V. 5. № 1. P. 138–139.
9. Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cardona-Felix C.S., Aguilar-González C.N., Flores-Gallegos A.C. *Enzymes in the Pharmaceutical Industry for  $\beta$ -Lactam Antibiotic Production.* / Ed. M. Kuddus. Acad. Press. 2019. Ch. 36. P. 627–643.

10. Sklyarenko A.V., Eldarov M. A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 6. P. 627–640.
11. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Sidorenko A.I., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 5. P. 452–464.
12. Эльдаров М.А., Склярченко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И., Епрмян А.С., Яроцкий С.В. // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 5. С. 646–651.
13. Eldarov M.A., Sklyarenko A.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Zhgun A.A., Dumina M.V., Medvedeva N.V., Satarova D.E., Ravin N.V., Yarockii S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 5. P. 505–510.
14. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V., Satarova D.E., Yarotsky S.V. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2011. V. 34. № 9. P. 1103–1117.
15. McDonald M.A., Bommarius A.S., Rousseau R.W. // Chem. Eng. Sci. 2017. V. 165. P. 81–88.
16. Santana M., Ribeiro M.P.A., Leite G.A., Giordano R.L.C., Giordano R.C., Mattedi S. // AIChE J. 2010. V. 56. № 6. P. 1578–1583.
17. Курочкина В.Б., Склярченко А.В. // Антибиотики и химиотерапия. 2005. № 5–6. С. 39–58.
18. Illanes A., Fajardo A. // Molecul. Catalysis B: Enzymatic. 2001. № 11. С. 587–595.
19. Illanes A., Anjari S., Arrieta R., Aguirre C. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2002. V. 97. № 3. P. 165–179.
20. Wei D.Z., Yang L. // Chem. Technol. Biotechnol. 2003. V. 78. № 4. P. 431–436.
21. Aguirre C., Toledo M., Medina V., Illanes A. // Process Biochem. 2002. V. 38. № 3. P. 351–360.
22. Illanes A., Cabrera Z., Wilson L., Aguirre C. // Process Biochem. 2003. V. 39. № 1. P. 111–117.
23. Illanes A., Anjari M.S., Altamirano C., Aguirre C. // J. Molecul. Catal. B: Enzymatic. 2004. V. 30. № 4. P. 95–103.
24. Hernández-Jústiz O., Terrenib M., Pagani G., J.L. Garcí A., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. // Enzyme Microb. Technol. 1999. V. 25. № 3–5. P. 336–343.
25. Terreni M., Ubiali D., Pagani G., Hernández-Jústiz O., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. // Enzyme Microb. Technol. 2005. V. 36. № 5–6. P. 672–679.

## Alternative Synthesis of Cefamandole Using Biocatalytic Acylation Catalyzed by Immobilized Cephalosporin-Acid Synthetase

A. V. Sklyarenko<sup>a</sup>\*, I. A. Groshkova<sup>a</sup>, I. N. Krestyanova<sup>a</sup>, and S. V. Yarotsky<sup>a</sup>

<sup>a</sup> National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

\*e-mail: asklyarenko@yandex.ru

The processes of biocatalytic acylation of 1-methyl-5-mercapto-1,2,3,4-tetrazolil-7-amino-cephalosporanic acid (7-TMCA) and 7-amino-cephalosporanic acid (7-ACA) by methyl ester of mandelic acid (MEMA) were optimized using an immobilized cephalosporin-acid synthetase as biocatalyst. Under optimized conditions in water-organic medium containing 43% (v/v) of ethylene glycol at 30°C with a spontaneous pH gradient in the range of 8.0–6.0 the following yields of the bicatalytic transformations were reached: 80.8 ± 1.9% for acylation of 7-TMCA (concentration 100–120 mM) resulted in cefamandole (CFM) production, and 88.6 ± 2.0% for acylation of 7-ACA (concentration 140–170 mM) resulted in semi-product of CFM (S-p CFM) production. In case of the second process a concentration of an target β-lactam product in a final reaction mixture is one and a half times higher than in case of the first one. Taking into account undoubted environmental benefits of a chemical transformation of S-p CFM to CFM over a process of a chemical production of 7-TMCA from 7-ACA we conclude that the second pathway of combined chemical and biocatalytic CFM synthesis is preferable.

**Keywords:** cefamandole, biocatalytic synthesis, cephalosporin-acid synthetase, acyl transfer synthesis, 7-aminocephalosporanic acid, solubility of key aminoacids

УДК 579:582.26

## ПРОДУКЦИЯ ДИАДИНОКСАНТИНА В ИНТЕНСИВНОЙ КУЛЬТУРЕ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ *Cylindrotheca closterium* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN. И ЕГО ПРОАПОПТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2022 г. Р. Г. Геворгиз<sup>1</sup>, \*, М. А. Гуреев<sup>2</sup>, \*\*, С. Н. Железнова<sup>1</sup>,  
Е. В. Гуреева<sup>1</sup>, М. В. Нехорошев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей  
им. А.О. Ковалевского” РАН, Севастополь, 299011 Россия

<sup>2</sup>Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова,  
Центр цифрового биодизайна и персонализированной медицины, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru

\*\*e-mail: max\_technik@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2021 г.

После доработки 29.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Изучена продукция диадинаксантина в интенсивной культуре *Cylindrotheca closterium*, а также его цитостатическая активность методами молекулярного моделирования и исследованиями на культурах опухолевых клеток человека: OVCAR5, OVCAR8, KURAMOCHI и OVSAHO. По результатам как вычислительного эксперимента, так и эксперимента с культурами клеток диадинаксантин демонстрирует более низкую активность по сравнению с фукоксантином (более чем в 4 раза). Величина IC<sub>50</sub> диадинаксантина достигалась при >100 мкМ, в то время как фукоксантин проявлял цитостатическое действие в пределах 18.75 мкМ. В проточной культуре *Cylindrotheca closterium* продукция диадинаксантина может превышать продукцию фукоксантина в 14 раз, что может сделать технологию его получения менее затратной и существенно снизить себестоимость лечебно-профилактических препаратов на основе микроводорослей.

**Ключевые слова:** морские микроводоросли, каротиноиды, *Cylindrotheca closterium*, молекулярный докинг, рак яичников, противоопухолевая активность

**DOI:** 10.31857/S0555109922010032

Морская диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* является источником целого ряда биологически активных веществ, которые представляют большой интерес для современной медицины и биотехнологии [1–3]. Особый интерес представляют каротиноиды морского генезиса, поскольку их биологическая активность позволяет создавать высокоэффективные препараты для профилактики и лечения тяжелых заболеваний. Например, фукоксантин (Fх), доля которого в биомассе *C. closterium* достигает 2% от сухой массы, являясь уникальным каротиноидом с алленовой связью проявляет высокую противоопухолевую активность [3, 4], а также цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака простаты PC-3, DU145 и LNCaP [5, 6], индуцирует апоптоз лейкозных клеток HL-60 и клеток рака толстой кишки Saco-2, HT-29 и DLD-1 [5–7], останавливая клеточный цикл в клетках GOTO нейробластомы и др.

Технология получения Fх в интенсивной культуре микроводорослей, как правило, основана на

двухстадийном накопительном культивировании [8, 9]: на первом этапе культивирования (экспоненциальная фаза роста) происходит накопление биомассы, а на втором (стационарная фаза роста) — биосинтез Fх. Накопление Fх наблюдается в условиях стресса, например при лимитировании роста биогенными элементами, поэтому именно условия второго этапа культивирования определяют количество синтезируемого Fх в клетках. Однако существенным недостатком двухстадийного накопительного культивирования является гибель небольшой части клеток микроводорослей в условиях стресса, поскольку в клетках микроводорослей происходит множество неустойчивых и неуправляемых деструктивных процессов, что в значительной мере снижает предсказуемость накопления Fх в технологическом процессе и эффективность технологии получения целевого продукта в целом.

Известно, что Fх является побочным продуктом диадинаксантинового цикла у диатомовых

водорослей [10, 11]. Именно при неблагоприятных условиях окружающей среды из диатиноксантина (Ddx) синтезируется Fx, что обуславливает накопление Ddx в экспоненциальной фазе, а Fx в стационарной фазе роста. Такая физиологическая особенность диатомовых водорослей дает возможность при разработке промышленной технологии получения Ddx этап создания стрессовых условий исключить, что в значительной мере ее упрощает и удешевляет, а также повышает эффективность процесса.

Несмотря на достаточно большое количество публикаций, посвященных исследованию проаптоптической активности каротиноидов морских организмов [12–16], данные об активности Ddx в литературе до сих пор отсутствуют.

Цель работы – изучение продукции Ddx в интенсивной культуре диатомовой водоросли *C. closterium* и оценка цитостатического эффекта Ddx методами молекулярного моделирования, а также на культурах опухолевых клеток человека.

## МЕТОДИКА

**Условия культивирования.** *C. closterium*, полученную из коллекции культур ФИЦ Институт биологии южных морей РАН выращивали в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объемом 3 л и толщиной рабочего слоя 5 см, при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , при круглосуточном освещении белыми люминесцентными лампами СЕРИЛ1LF36W/54-765-2450 lm, которые на рабочей поверхности давали 150 мкмоль квантов/( $\text{м}^2 \cdot \text{с}$ ) (33 Вт/ $\text{м}^2$ ). Культуру выращивали в накопительном режиме на питательной среде RS, приготовленную на стерильной черноморской воде, следующего состава (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 0.75,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.0641,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 0.386,  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$  – 0.0872,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.05,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  –  $0.2 \times 10^{-3}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0.44 \times 10^{-3}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  –  $0.2 \times 10^{-3}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  –  $0.36 \times 10^{-3}$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  –  $0.12 \times 10^{-3}$  [17]. В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1.5 л воздуха на литр культуры в минуту).

Измерение плотности культуры микроводорослей приводили путем взвешивания сырой массы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках с погрешностью 0.1 мг после осаждения клеток центрифугированием при 1600 g в течение 2 мин. Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали коэффициент связи между сухой и сырой массой ( $k = 0.1$ ) [18].

Fx и Ddx в биомассе *C. closterium* определяли по разработанной нами ранее методике [19]. Коэффициент экстинкции ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) для Ddx в ацетоне принимали равным 2230 мл/( $\text{мг} \cdot \text{см}$ ) при 448 нм

[20], а для фукоксантина в спирте – 1280 мл/( $\text{мг} \cdot \text{см}$ ) при 448 нм [21].

**Выделение каротиноидов.** Для получения Fx и Ddx в кристаллической форме предварительно проводили трехкратную экстракцию липидов смесью Фолча из 30 г сырой массы *C. closterium* (3 г сухой массы) с концентрацией Fx и Ddx 7 и 1.5 мг/г сухой массы соответственно. При первой экстракции использовали 100 мл смеси Фолча в соотношении спирт-хлороформ 1 : 1. Две последующих экстракции проводили смесью Фолча объемом по 50 мл в соотношении спирт-хлороформ 1 : 2 до полного обесцвечивания биомассы.

Все экстракты объединяли и трехкратно промывали дистиллированной водой в соотношении 1 : 3 для удаления нелипидных примесей. Хлороформную фракцию упаривали на ротаторном испарителе при температуре  $30^\circ\text{C}$ . Концентрат липидов хроматографировали на колонке (диаметр 1.5 см, высота 22 см). В качестве носителя использовали силикагель марки Lachema 100/250 мкм. Элюировали смесью гексан–ацетон в соотношении 7 : 3. Полученную фракцию Fx и Ddx в дальнейшем перекристаллизовывали из смеси диэтилового эфира-гексана или хлористого метилена-гексана. Выделившиеся кристаллы Fx и Ddx промывали гексаном и высушивали в потоке аргона. Было получено 13 мг кристаллического Fx и 2.5 мг кристаллического Ddx, при этом потери Fx при кристаллизации составили 38.1%, а Ddx – 45.5%.

Каротиноиды идентифицировали по известным величинам  $R_f$  и спектральным (UV-Vis) характеристикам [20, 22, 23]. Отношение полос поглощения (III/II) для Ddx составляло 90% и совпадало с данными литературы [20]. Кристаллический Fx был также охарактеризован методами ВЭЖХ, масс- и ЯМР-спектроскопии. Изомеры Fx разделяли на жидкостном хроматографе высокого давления Shimadzu LC-6AD (Shimadzu, Япония), снабженном колонкой длиной 250 мм. Внутренний диаметр колонки 4.6 мм, неподвижная фаза – силикагель, растворитель ацетон-гексан (3 : 7), скорость подачи элюанта 1 мл/мин, регистрация при 450 нм. Спектры протонного магнитного резонанса (HNMR, 500 МГц) снимали на Varian UNITY INOVA 500 (Varian, США) в дейтерохлороформе, в качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан (TMS). Масс-спектры (Fast Atom Bombardment MS) получены на спектрометре JEOL JMS HX 110 Å (JEOL, Япония) на матрице из мета-нитробензилового спирта. На рис. 1а представлены данные препаративного разделения изомеров кристаллического Fx. После перекристаллизации Fx из хлористого метилена-гексана соотношение изомеров составило 99:0.5. Спектр протонного магнитного резонанса кристаллического Fx (рис. 1б) соответствует all-trans Fx, который был описан ранее [24]. Основ-

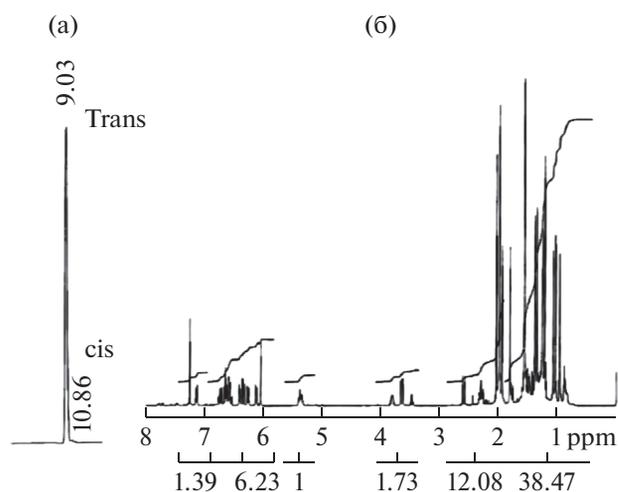
ные пики масс-спектра:  $m/z$  681.4078  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  659.4272  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  641.4172  $[MH-18]^+$  идентичны для Fx. Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях (UV-VIS) в метаноле соответствовали all-trans Fx и совпадали с литературными данными [25].

**Молекулярный докинг.** Молекулярный докинг проводили в программе Glide [26]. Структура белка HER2 загружена из базы данных RCSB Protein DataBank [27] (номер структуры: 3RCD). Перед проведением расчетов модель белка прошла проверку на наличие ошибок и дефектов с применением модуля Protein PrepWizard [28]. Для исследуемых малых молекул проведена генерация трехмерных координат в силовом поле OPLS3e с использованием модуля LigPrep [28].

Область докинга малых молекул построена на основе центроида координат лиганда в модели белка HER2. Ввиду больших размеров исследуемых лигандов, размер грани кубической области докинга составил 23 ангстрем. Процедура молекулярного докинга проводилась без каких-либо позиционных ограничений. Для каждого лиганда отобраны 20 решений докинга (укладок). Релевантность метода докинга проверена путем повторного докинга контрольного лиганда (представлен в рассматриваемой модели белка HER2) в активную полость. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) лучшей расчетной укладки от данных рентгеноструктурного анализа составило 0.23. Оценка результатов молекулярного докинга проводилась путем сравнения показателей скоринг-функции GlideScore и Emodel.

**Клеточные линии.** Для экспериментов использованы следующие клеточные линии опухолевых клеток (рак яичников человека): OVCAR5 (CVCL\_1628), OVCAR8 (CVCL\_1629), KURAMOCHI (CVCL\_1345) и OVSANO (CVCL\_3114) [https://web.expasy.org/cellosaurus/]. Образцы клеточных линий получены из банка клеток American Type Culture Collection (ATCC), культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в увлажненном инкубаторе в соответствии с инструкциями поставщика. Культуры клеток выращивали с избытком, с целью оценки уровня заражения микоплазмой с использованием специализированного ПЦР-теста. Используемая среда для культивирования – RPMI (“Lonza”, Швейцария).

**Исследование выживаемости.** Исследуемые соединения (Fx, Ddx) приготовлены в виде растворов с шестью разными концентрациями: 5, 10, 15, 50, 100 мкМ/л. Каждая концентрация в четырех повторностях. Растворы размещены в 384-луночных планшетах (“Corning”, США) с использованием жидкостного автодозатора Echo 550 (“Labcyte”, США). В качестве негативного контроля использован 0.1% раствор ДМСО и 100 мкМ/л раствор бензетония хлорида соответственно. В



**Рис. 1.** ВЭЖХ изомеров кристаллического фукоксантина после перекристаллизации фукоксантина из хлористого метилена–гексана (а), спектр протонного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H NMR) кристаллического фукоксантина (б).

ячейки планшета с растворами Fx и Ddx добавлено по 50 мкл суспензии клеток, что соответствовало плотности 1000 кл. на ячейку. После 72 ч инкубирования проведен анализ выживаемости клеток и цитотоксичности. Реагент CellTiter-Glo (“Promega”, Германия) добавляли по 25 мкл в каждую лунку, люминесценцию регистрировали после 10-минутной выдержки при комнатной температуре с помощью ридера PheraStar (“BMG Labtech”, Германия). Выживаемость клеток рассчитывали путем нормализации позитивного и негативного контролей по следующей формуле:

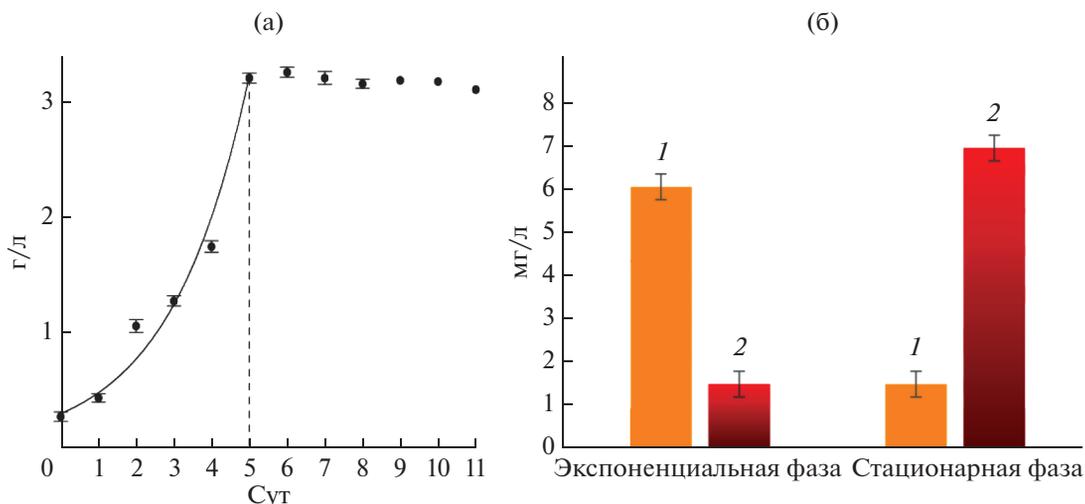
$$\text{Выживаемость} = \frac{\text{CTG}_{\text{drug}} - \text{CTG}_{\text{benz}}}{\text{CTG}_{\text{DMSO}} - \text{CTG}_{\text{benz}}}, \quad (1)$$

где  $\text{CTG}_{\text{drug}}$  – (CellTiter-Glo) интенсивность флуоресценции титрующего агента для клеток под действием исследуемого соединения,  $\text{CTG}_{\text{benz}}$  – уровень флуоресценции положительного контроля (100 мкМ раствор бензетония хлорид),  $\text{CTG}_{\text{DMSO}}$  – соответствующий показатель для негативного контроля (ДМСО).

Все измерения проводили в четырех аналитических повторностях. На рисунках приведены средние значения и среднеквадратическое отклонение. Для расчета доверительных интервалов использовали t-критерий Стьюдента для 95% вероятности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте накопительная культура *C. clostridium* характеризовалась достаточно высокими продукционными показателями. Лаг-фаза практически отсутствовала, экспоненциальная фаза роста длилась 5 сут, стационарная фаза роста – с 5 по 11 сут, после чего культура переходила в фазу отми-



**Рис. 2.** Динамика плотности накопительной культуры *C. closterium* в эксперименте (а) (линией отмечена аппроксимация данных уравнением (2) в экспоненциальной фазе роста); (б) – концентрация диадиноксантина (1) и фукоксантина (2) в экспоненциальной и стационарной фазах роста.

рания (рис. 2а). В экспоненциальной фазе роста в биомассе *C. closterium* наблюдалось накопление преимущественно Ddx, к концу стационарной фазы роста накапливался Fx (рис. 2б). Средняя скорость биосинтеза Ddx в экспоненциальной фазе роста составила 1.22 мг/(л·сут). За все время накопительного культивирования средняя скорость биосинтеза Fx составила 0.636 мг/(л·сут). Таким образом, очевидно, что получение Ddx на основе накопительной культуры *C. closterium* занимает вдвое меньше времени, чем Fx. Кроме того, поскольку накопление Ddx наблюдалось именно в активно растущей культуре, еще больший выход в единицу времени возможен в проточной культуре, например, хемостате.

Для предельной оценки продуктивности *C. closterium* и скорости биосинтеза Ddx в хемостате аппроксимировали экспериментальные данные методом наименьших квадратов и рассчитали величину удельной скорости роста ( $\mu$ ) в экспоненциальной фазе роста (рис. 2а):

$$B(t) = B_0 \cdot e^{\mu t}; \quad B(t) = 0.3 \cdot e^{0.5t}. \quad (2)$$

где  $B_0 = 0.3$  – плотность культуры в момент времени  $t_0 = 0$ , г/л;  $\mu = 0.5$  – удельная скорость роста, 1/сут.

Продуктивность ( $P$ ) проточной культуры равна:

$$P = \omega \cdot B, \quad (3)$$

где  $\omega$  – скорость разбавления культуры (удельная скорость протока), 1/сут;  $B$  – текущая плотность культуры, которая в свою очередь определяется выражением:

$$B(t) = B_H \cdot e^{(\mu - \omega)(t - t_H)}, \quad (4)$$

где  $B_H$  – плотность культуры в момент включения протока  $t_H$ .

Из формулы (3) ясно, что продуктивность культуры в хемостате будет тем больше, чем больше величины удельной скорости протока и текущей плотности культуры. Однако эти величины ограничены рабочей областью хемостата:  $0 < \omega \leq \mu$  и  $B_0 < B_H < B_{\max}$ , где  $B_{\max}$  – плотность культуры в стационарной фазе роста.

Подставляя (4) в (3), получим:

$$P = \omega \cdot B_H \cdot e^{(\mu - \omega)(t - t_H)}. \quad (5)$$

Из последнего выражения следует, что в рабочей области хемостата максимальная продуктивность будет достигаться в условиях стационарного динамического равновесия при  $\omega = \mu$  и  $B_H \rightarrow B_{\max}$ .

Поскольку в условиях стационарного динамического равновесия рост культуры микроводорослей характеризуется неизменностью биохимического состава биомассы, используя выражение (5), скорость биосинтеза Ddx в хемостате ( $P_{\text{Ddx}}$ ) можно представить как:

$$P_{\text{Ddx}} = \omega \cdot \delta_{\text{Ddx}} \cdot B_H \cdot e^{(\mu - \omega)(t - t_H)}, \quad (6)$$

где  $\delta_{\text{Ddx}}$  – доля Ddx в биомассе *C. closterium*.

Подставив в (6) данные эксперимента ( $\omega = 0.5$  1/сут,  $\delta_{\text{Ddx}} = 0.0061$ ,  $B_H = 3$  г/л), получим предельное значение продуктивности Ddx в хемостате для установившегося процесса:

$$P_{\text{Ddx}} = 0.5 \times 0.0061 \times 3 = 9.15 \times 10^{-3} \text{ г/(л} \cdot \text{сут)}.$$

Таким образом, можно видеть, что в проточной культуре скорость биосинтеза Ddx превышает среднюю скорость биосинтеза Ddx в накопительной культуре в 7.5 раз, а Fx – в 14 раз.

В дальнейшем была проведена оценка прооптической активности Ddx и Fx. Эксперименты на клетках, а также анализ тематических публика-

**Таблица 1.** Основные мишени, рассматриваемые в контексте развития низкомолекулярных индукторов апоптоза

Мишень	Культура клеток	Ссылка
Bcl2	SGC-7901 (рак желудка)	[16]
	HepG2 cancer	[14]
Bcl-xl	human leukemia cell HL-60	[13]
PI3k	human cervical cancer	[12]
	Глиома человека	[12]
Akt	human cervical cancer	[12]
	Глиома человека	[12]
NF- $\kappa$ B	human cervical cancer	[12]
	Глиома человека	[12]

ций показал наличие проапоптотических процессов, индуцируемых Fx и его метаболитами [12–16]. В табл. 1 приведены наиболее значимые мишени, связанные с развитием проапоптотических процессов.

С целью более точного определения потенциальной мишени для исследуемых активных веществ был изучен генетический профиль клеточной культуры OVCAR4 (рак яичников человека [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_1628](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1628)). Анализ генома клеточных культур нормальных клеток яичников и рака яичников проведен с помощью инструмента BioGPS [29], а также базы данных KEGG [30]. Список генов, задействованных в процессе канцерогенеза: 1. BRCA1 (germline mutation/deletion) [HSA:672] [KO:K10605]; 2. BRCA2 (germline mutation/deletion) [HSA:675] [KO:K08775]; 3. MSH2 (germline mutation) [HSA:4436] [KO:K08735]; 4. MLH1 (germline mutation) [HSA:4292] [KO:K08734]; 5. ERBB2 (amplification/overexpression) [HSA:2064] [KO:K05083]; 6. K-ras (mutation) [HSA:3845] [KO:K07827]; 7. AKT2 (amplification) [HSA:208] [KO:K04456]; 8. PIK3CA (amplification) [HSA:5290] [KO:K00922]; 9. c-MYC (overexpression) [HSA:4609] [KO:K04377]; 10. p53 (mutation / deletion, overexpression) [HSA:7157] [KO:K04451].

Ранее упомянутые мишени, к которым селективен Fx и его производные, в данном генетическом профиле отсутствуют. Однако проапоптоти-

ческий эффект есть. Среди перечисленных генов, стоит обратить внимание на ERBB2, кодирующий белок HER2, который наиболее часто связан с развитием рака яичников у человека.

HER2 (англ. human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) — трансмембранный белок, тирозинкиназа, относящаяся к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR/ErbB). Амплификация или повышенная экспрессия гена данного белка играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов злокачественных новообразований, являясь важным биомаркером и терапевтической мишенью.

Анализ структуры белка HER2, имеющейся в базе данных RCSB Protein Data Bank, показал наличие работ, демонстрирующих возможность негативной модуляции активности данного белка с помощью низкомолекулярных агентов [31, 32]. В частности, при рассмотрении трехмерной модели белка HER2 в комплексе с селективным ингибитором TAK-285 (модель 3RCD в Protein Data Bank), нами установлен линейный характер структуры низкомолекулярного ингибитора. В связи с этим, был проведен вычислительный эксперимент по симуляции процесса взаимодействия Ddx и Fx с активной полостью белка HER2.

Оценка сродства малых молекул проведена с помощью метода молекулярного докинга. Рассчитана область потенциального взаимодействия. При этом, размер области связывания выбран в соответствии с геометрией исследуемых лигандов, так как они значительно больше лиганда в активной полости TAK-285. В итоге, получены результаты, которые представлены в табл. 2.

Проведенные расчеты показали, что Ddx парциально имитирует гидрофобное взаимодействие с аминокислотами активной полости белка HER2. Отсутствие ароматического скаффолда в случае рассматриваемого каротиноида приводит к значительной потере гидрофобных контактов. Однако, если обратиться к рис. 4б, то можно увидеть, что основные гидрофобные/полярные/электростатические контакты реализованы аналогично контрольному лиганду. Данный факт позволяет говорить о потенциальной реализуемости специфического взаимодействия с белком HER2. К тому же,

**Таблица 2.** Показатели расчетного сродства исследуемых соединений в отношении белка HER2

Структура	GlideScore (ккал/моль)	Emodel (ккал/моль)	IC <sub>50</sub> (мкмоль)
Фукоксантин	–7.18	–44.72	18.75
Диадиноксантин	–6.61	–44.61	>100
Контроль (в модели белка HER2)	–9.72	–102.4	0.017

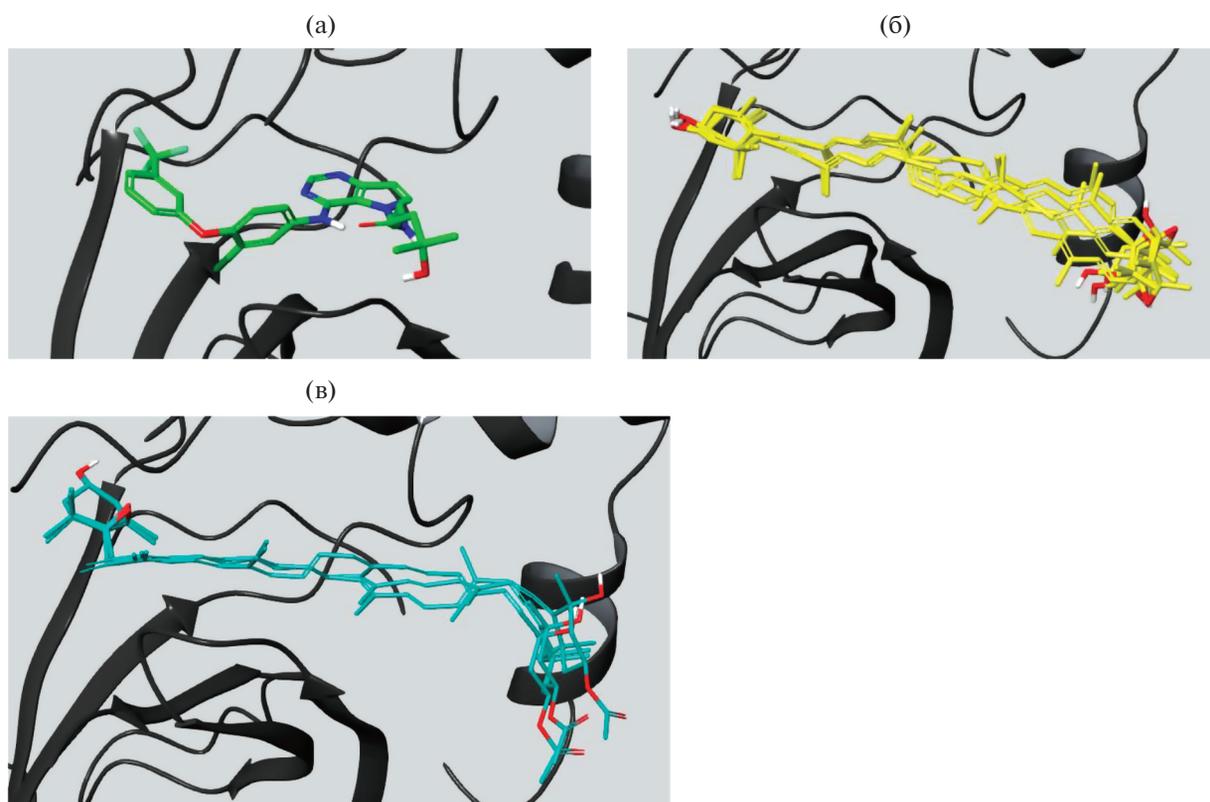


Рис. 3. Укладка исследуемых соединений в активной полости белка HER2: контрольный лиганд TAK-285 (а), диадинноксантин (б), фукоксантин (в).

расчеты показывают достаточно высокий уровень кластеризации решений докинга, что также косвенно говорит о потенциальной сайтоспецифичности взаимодействия (рис. 3б). Аналогично и со структурой Fx. Соединение за счет линейной структуры с сопряженными двойными связями обладает весьма высоким потенциалом гидрофобного взаимодействия, за счет чего довольно эффективно оккупирует активную полость HER2. Тем не менее, отсутствие ароматических мотивов в структуре снижает сайтоспецифичность взаимодействия (рис. 4).

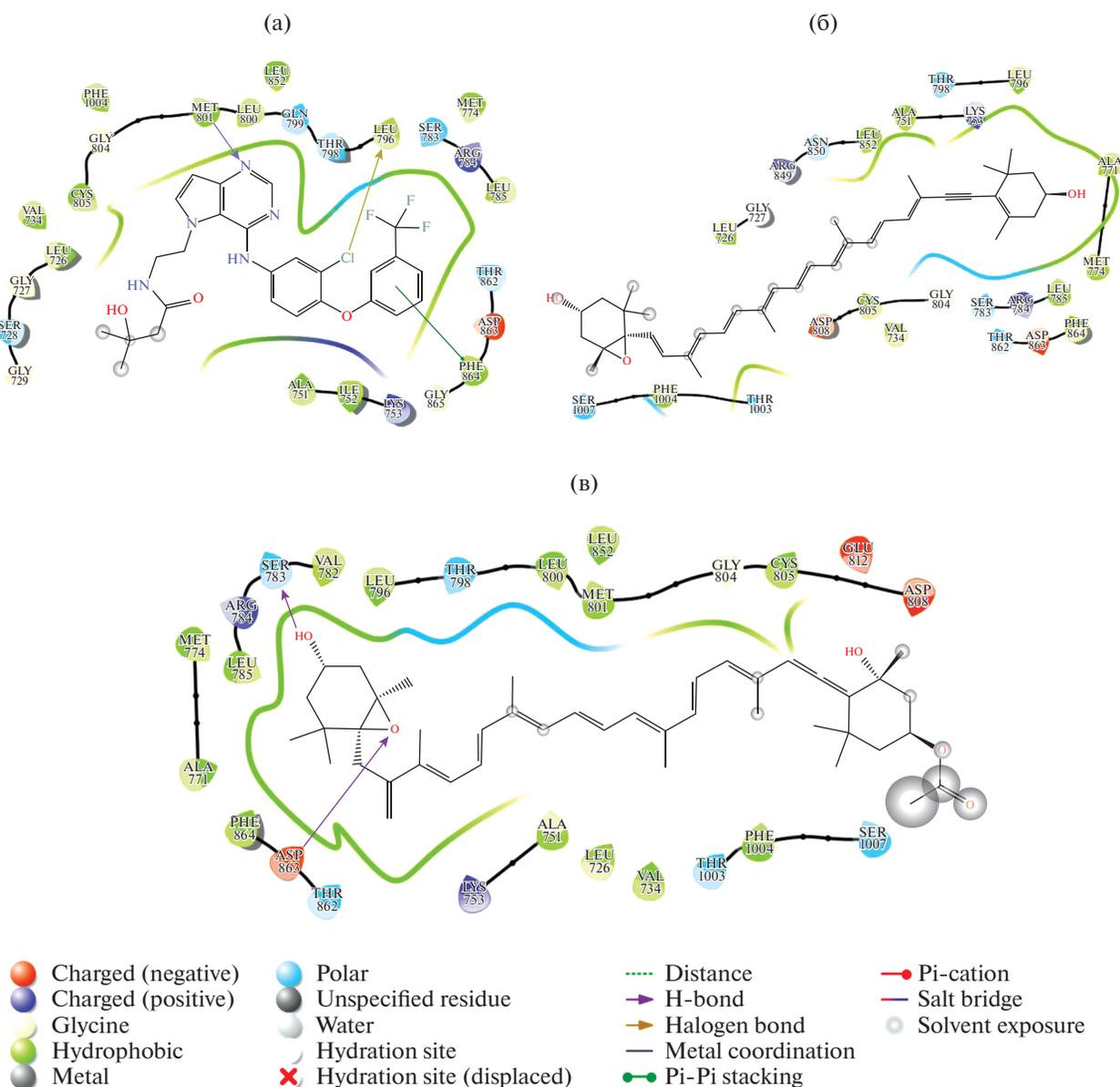
Результаты расчетов показали, что в сравнении с референсной структурой TAK-285 Fx и Ddx обладают более низкими показателями активности. Рассматривая величину GlideScore как аналог свободной энергии Гиббса ( $\Delta G$ ) можно утверждать, что расчетная константа ингибирования различается примерно на три порядка ( $1000\times$ ). Данные результаты согласуются с экспериментальным уровнем активности:  $\Delta\text{GlideScore (Ddx)} = 3.11$ ;  $\text{IC}_{50 \text{ Ddx/peф}} = 5882.35$ ;  $\Delta\text{GlideScore (Fx)} = 2.54$ ,  $\text{IC}_{50 \text{ Fx/peф}} = 1102.94$ .

Проведенный нами эксперимент по изучению цитостатического эффекта Ddx и Fx с культурами клеток OVCAR5, OVCAR8, KURAMOCHI и

OVSANO (Серозная аденокарцинома яичников с вариантами мутаций в ERBB2/p53/KRAS) показал, что для соединения Ddx величина  $\text{IC}_{50}$  достигалась при концентрации  $>100$  мкМ (рис. 5а).

Результаты анализа жизнеспособности клеточных линий рака яичников показали, что Fx проявлял цитостатическое действие с  $\text{IC}_{50}$  в пределах 18.75 мкМ (рис. 5б). Этот эффект воспроизводился во всех протестированных клеточных линиях. Ddx снижал жизнеспособность клеток на 40% только при наивысшей протестированной концентрации (100 мкМ). В то время как эффект от воздействия Fx более выражен уже в диапазоне физиологических концентраций, а токсический ответ был достигнут при концентрации 18.75 мкМ. Клеточная линия OVCAR4 показала самую высокую чувствительность к Fx и Ddx среди протестированных клеточных линий (рис. 5б).

На основании полученных результатов можно предположить, что в случае применения Ddx, цитостатический эффект достигался за счет подавления активности гиперэкспрессированного белка HER2, отвечающего за рост клеток. Стоит также отметить, что гиперэкспрессированный HER2 ответственен за резистентность к химиотерапии опухолевых клеток [33]. Селективное взаимодей-



**Рис. 4.** Диаграмма лиганд-белковых взаимодействий исследуемых соединений с белком HER2: референсный лиганд TAK-285 (а), диадиноксантин (б), фукоксантин (в).

стве с данным белком отчасти объясняет явление сенсибилизации клеток к цитостатикам под воздействием каротиноидов, применяемых в комбинации с химиотерапией [2].

По данным как вычислительного эксперимента, так и эксперимента с культурами клеток Ddx демонстрирует более низкую активность по сравнению с Fx (более чем в 4 раза). Но для полноты исследований проапоптической активности Ddx требуется расширенный эксперимент с использованием клеточной репортерной системы, демонстрирующей специфическую активацию процессов клеточной смерти. При этом, в качестве положительного контроля должны быть использованы

существующие специфические ингибиторы белка HER2.

Несмотря на низкую проапоптотическую активность Ddx, скорость его продукции в проточной культуре *C. closterium* может превышать среднюю скорость накопления Fx в 14 раз, что может сделать технологию его получения менее затратной и существенно снизить себестоимость препаратов лечебно-профилактического характера на основе микроводорослей. Отметим, в качестве профилактики онкозаболеваний человеку рекомендуется ежедневное употребление 0.5 мг в сутки Fx [<https://www.oryza.co.jp/cms/wp-content/uploads/2019/06/e1d04e41b30d14f57abeab355f965f9a.pdf>], что

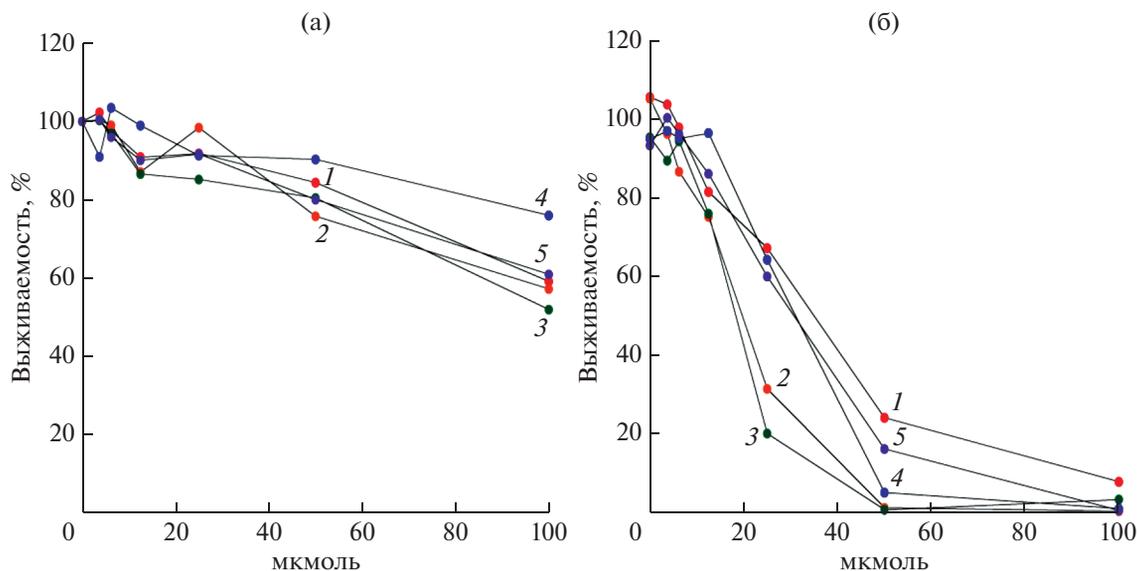


Рис. 5. Цитостатический эффект диадиноксантина (а) и фукоксантина (б) на клеточных линиях: 1 – KURAMOCHI; 2 – HEK293; 3 – OVCAR4; 4 – OVCAR8; 5 – OVSAHO.

соответствует 0.07 г сухой биомассы *C. closterium*. Если в качестве профилактики использовать Ddx, как альтернативу Fx, то, учитывая более низкую активность Ddx, потребуется минимум 0.33 г сухой биомассы *C. closterium* в сутки.

Авторы выражают благодарность Акимову Е.А. (Institute for Molecular Medicine Finland, HiLIFE) и доктору философии Т. Маока (Research Institute for Production Development, Киото, Япония) за помощь в экспериментальной работе с клеточными культурами и идентификации каротиноидов.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ ИнБЮМ по теме “Исследование механизмов управления производственными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса” (№ госрегистрации 121030300149-0) и госзадания Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках проекта по созданию и развитию научно-исследовательских центров мирового уровня “Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение” (№ госрегистрации 075-15-2020-926).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De la Cuesta J.L., Manley S.L. // *Limnol. and Oceanogr.* 2009. V. 54. P. 1653–1664. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.5.1653>
2. Wang Z., Li H., Dong M., Zhu P., Cai Y. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2019. V. 145. № 2. P. 293–301. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02841-2>
3. Wang C., Chen X., Nakamura Y., Yu C., Qi H. // *Food & Function.* 2020. V. 11. № 11. P. 9338–9358. <https://doi.org/10.1039/d0fo02176h>
4. Méresse S., Fodil M., Fleury F., Chénais B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. P. 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms21239273>
5. Jaswir I., Noviendri D., Taher M., Mohamed F., Octavianti F., Lestari W. et al. // *Molecules.* 2019. V. 24. № 5. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24050947>
6. Satomi Y. // *Anticancer Res.* 2017. V. 37. № 4. P. 1557–1562. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11484>
7. Kumar S.R., Hosokawa M., Miyashita K. // *Mar. Drugs.* 2013. V. 11. P. 5130–5147. <https://doi.org/10.3390/md11125130>
8. Геворгуз П.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Пенков А.П., Лелеков А.С. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2016. Т. 1. С. 73–77.
9. Lu X., Sun H., Zhao W., Cheng K.-W., Chen F., Liu B. // *Mar. Drugs.* 2018. V. 16. № 7. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/md16070219>
10. Kuczynska P., Jemiola-Rzeminska M., Strzalka K. // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13. № 9. P. 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
11. Guo B., Liu B., Yang B., Sun P., Lu X., Liu J. et al. // *Mar. Drugs.* 2016. V. 14. № 7. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/md14070125>
12. Jin, Y., Qiu S., Shao N., Zheng J. // *Med. Sci. Monit.* 2018. V. 24. P. 11–18. <https://doi.org/10.12659/MSM.905360>
13. Kim K.N., Heo S.J., Kang S.M., Ahn G., Jeon Y.J. // *Toxicol. in Vitro.* 2010. V. 24. № 6. P. 1648–1654. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.023>
14. Foo S.C., Yusoff F.M., Imam M.U., Foo J.B., Ismail N., Azmi N.H. et al. // *Biotechnol. Rep. (Amst).* 2019.

- V. 21. P. 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00296>
15. Wu H.L., Fu X.Y., Cao W.Q., Xiang W.Z., Hou Y.J., Ma J.K. et al. // J. Agric. Food Chem. 2019. V. 67. № 8. P. 2212–2219.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07126>
  16. Zhu Y., Cheng J., Min Z., Yin T., Zhang R., Zhang W. et al. // J. Cell Biochem. 2018. V. 119(9). P. 7274–7284.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.27022>
  17. Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Бобко Н.И., Лелеков А.С. // Актуальная биотехнология. 2015. Т. 14. № 3. С. 46–48.
  18. Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5. № 1. С. 201–207.
  19. Рябушко В.И., Железнова С.Н., Нехорошев М.В. // Альгология, 2017. Т. 27(1) С. 15–21.  
<https://doi.org/10.15407/alg27.01.015>
  20. Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. // JMBA. 1997. V. 77(3). 661 p.  
<https://doi.org/10.1017/S0025315400036389>
  21. Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S.K., Mizuno M., Yoshimura K. et al. // BJN. 2009. V. 102. № 2. P. 242–248.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114508199007>
  22. Whittle S.J., Casselton P.J. // Br. Phycol. J. 1975. V. 10. № 2. P. 192–204.  
<https://doi.org/10.1080/00071617500650181>
  23. Kuczynska P., Jemiola-Rzeminska M.I. // Appl. Phycol. 2017. V. 29. P. 79–87.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-016-0961-x>
  24. Englert G., Biornland T., Liaaen-Jensen S. // Magnetic Resonance in Chemistry. 1990. V. 28. № 6. P. 519–528.  
<https://doi.org/10.1002/mrc.1260280610>
  25. Maeda H., Hosokawa M., Sashima T., Funayama K., Miyashita K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 332. № 2. P. 392–397.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.002>
  26. Friesner R.A., Banks J.L., Murphy R.B., Halgren T.A., Klicic J.J., Mainz D.T. et al. // J. Med. Chem. 2004. V. 47. № 7. P. 1739–1749.  
<https://doi.org/10.1021/jm0306430>
  27. Burley S.K., Berman H.M., Bhikadiya C., Bi C., Chen L., Di Costanzo L. et al. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. (Database issue), D464–D474.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>
  28. Sastry G.M., Adzhigirey M., Day T., Annabhimoju R., Sherman, W. // J. Comput Aided Mol. Des. 2013. V. 27. № 3. P. 221–234.  
<https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
  29. Wu C., Jin X., Tsueng G., Afrasiabi C., Su A.I. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. (D1). P. 313–316.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1104>
  30. Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. (D1). P. 457–462.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
  31. Rampogu S., Son M., Baek A., Park C., Rana R. M., Saravanan A.Z. et al. // Computational Biology and Chemistry 2018. V. 74. P. 327–338.  
<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.04.002>
  32. Yoshioka T, Shien K, Namba K, Torigoe H., Sato H., Tomida S. et al. // Cancer Sci. 2018. V. 109. № 4. P. 1166–1176.  
<https://doi.org/10.1111/cas.13546>
  33. Harris F.R., Zhang P., Yang L., Hou X., Leventakos K., Weroha S.J. et al. // Mol. Oncol. 2019. V. 13. № 2. P. 132–152.  
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12414>

## Production of Diadinoxanthin in Intensive Culture of the Diatomaceous Alga *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. and Its Pro-Apoptotic Activity

R. G. Gevorgiz<sup>a,\*</sup>, M. A. Gureev<sup>b,\*\*</sup>, S. N. Zheleznova<sup>a</sup>, E. V. Gureeva<sup>a</sup>, and M. V. Nechoroshev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol, 299011 Russia

<sup>b</sup> Research Center “Digital biodesign and personalized healthcare”, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: r-gevorgiz@yandex.ru

\*\*e-mail: max\_technik@mail.ru

In this study, we estimate the production of diadinoxanthin and its cytostatic activity in an intensive culture of *C. closterium* by molecular modeling and experiments with human tumor cell cultures OVCAR5, OVCAR8, KURAMOCHI and OVSAHO. According to the data of both the simulation and experiments with the cell cultures, diadinoxanthin demonstrates lower activity (by a factor of more than 4) in comparison with fucoxanthin. The IC<sub>50</sub> value for diadinoxanthin is achieved at a concentration of above 100 μM, while fucoxanthin exhibits a cytostatic effect below 18.75 μM. In a flow-through culture of *C. closterium*, the production of diadinoxanthin can exceed the production of fucoxanthin by 14 times, which can make a technology for its production less expensive and significantly reduce the cost of therapeutic and prophylactic drugs based on microalgae.

**Keywords:** marine microalgae, carotenoids, *Cylindrotheca closterium*, molecular docking, ovarian cancer, antitumor activity

УДК 547.917:544.4.0327:66.095.118:664.952.957

## МЕХАНИЗМ ДЕАЦЕТИЛИРОВАНИЯ ХИТИНА И ХИТОЗАНА ПРИ ДЛИТЕЛЬНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ОБРАБОТКЕ

© 2022 г. В. Ю. Новиков<sup>1, 2, \*</sup>, И. Н. Коновалова<sup>2</sup>, Н. В. Долгопятова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Полярный филиал Всесоюзного научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (Полярный научно-исследовательский институт морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М. Книповича), Мурманск, 183038 Россия

<sup>2</sup>Мурманский государственный технический университет (МГТУ), кафедра химии, Мурманск, 183010 Россия  
\*e-mail: nowitaly@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.08.2021 г.

После доработки 16.11.2021 г.

Принята к публикации 30.12.2021 г.

Исследовано деацетилирование крабового хитина в растворах гидроксида натрия NaOH при получении хитозана. Сделаны предположения о механизме реакции на двух участках кинетической кривой, соответствующих быстрому и медленному деацетилированию. Быстрое деацетилирование связано с атакой гидроксид-ионами (OH<sup>-</sup>) ацетамидных связей хитина. Реакция деацетилирования начиналась на границе полной гидратации ионов OH<sup>-</sup> при концентрации NaOH около 20% и ее скорость росла с увеличением концентрации щелочи. При концентрации NaOH выше 50% скорость быстрого деацетилирования снижалась, по-видимому, вследствие уменьшения концентрации гидроксид-ионов в результате ионной ассоциации Na<sup>+</sup> и OH<sup>-</sup>. При медленном деацетилировании скорость реакции с увеличением концентрации щелочи снижалась и деацетилирование останавливалось при концентрации NaOH – 60%. Вероятно, основная причина остановки реакции заключается в образовании кинетически устойчивого аниона хитозана в реакции бимолекулярного нуклеофильного замещения второго порядка S<sub>N</sub>2 с участием двух гидроксид-ионов.

*Ключевые слова:* хитин, хитозан, деацетилирование, гидратация, кинетика, механизм реакции

DOI: 10.31857/S0555109922030096

Природные полисахариды хитин и хитозан представляют интерес для многих отраслей пищевой промышленности, медицины, сельского хозяйства [1]. Известно, что биологическая активность и другие свойства хитозана определяются двумя параметрами: молекулярной массой (ММ) и степенью деацетилирования (СД), при этом для удовлетворения потребности различных областей эти параметры должны изменяться независимо друг от друга.

До настоящего времени основной объем исследований проведен на хитозане со СД более 70% [2]. В сведениях, приведенных в научно-технической литературе, не обнаружено однозначной связи свойств хитозана с СД. В большинстве случаев необходимые свойства хитозана увеличиваются с ростом СД, например, такие как адсорбционная емкость [3], вязкость растворов, нейтоновские реологические свойства и энергии активации потока [4], антибактериальная и противогрибковая активность [5]. Хитозан с СД более 90% считается перспективным материалом для регенерации периферических нервов [6].

В некоторых случаях требуется полисахарид с низкой или средней СД. С увеличением СД снижаются прочность мембран при растяжении, но увеличивается индекс набухания [7]. Растворимость в воде наблюдается при средней СД около 50% [8]. Исследование ферментативного расщепления гликозидных связей хитозана лизоцимом показало, что максимальная скорость расщепления наблюдалась при средней СД около 50%, при СД более 60% скорость расщепления снижалась, а при СД 97% хитозан лизоцимом не расщеплялся [9, 10].

При щелочном деацетилировании хитина, которое используется для промышленного получения хитозана, в отсутствие молекулярного кислорода гликозидные связи, по аналогии с простой эфирной связью, являются устойчивыми, а ацетамидные связи легко расщепляются, что позволяет получать высокомолекулярный хитозан с высокой СД.

Процесс регулирования СД полисахарида ограничен особенностью кинетики реакции щелочного деацетилирования, которая заключается в быст-

ром росте СД в первые 30–60 мин до значений 75–80% и медленном росте СД в течение нескольких часов после 60 мин до 85% [11, 12]. Небольшое повышение СД до 90–95% достигается при длительной обработке хитозана в концентрированной щелочи при высокой температуре и сопровождается значительным уменьшением ММ.

Существует способ дискретного деацетилирования хитина, позволяющий быстро увеличить СД практически до 100% с сохранением высокой ММ [13].

Вопрос, связанный с причиной остановки реакции щелочного деацетилирования после 60 мин от начала реакции, остается нерешенным.

Известно, что гликозидные связи хитина и хитозана проявляют устойчивость к действию концентрированных растворов щелочей. В деаэрированных растворах и в растворах с акцепторами окислительных радикалов деструкция полисахаридной цепи очень мала [14], при этом СД достигает и сохраняется на уровне 80–85% [15].

Изучение механизма реакции деацетилирования в настоящее время остается актуальным, поскольку независимое друг от друга регулирование ММ и СД хитозана является важной практической задачей.

Цель работы – выяснение особенностей механизма реакции деацетилирования хитина при длительной обработке в концентрированных растворах щелочи.

## МЕТОДИКА

Объектами исследования служили образцы хитина, полученные из панциря камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* по технологии, включающей депротеинизацию 4%-ным раствором NaOH, деминерализацию 7.2%-ным раствором HCl и повторную депротеинизацию 4%-ным раствором NaOH [12]. Высушенные на воздухе образцы хитина измельчали на конусной дробилке и просеивали через сито со стороны ячейки 0.1 мм.

Реакцию деацетилирования проводили в стеклянных колбах на глицериновой бане при температуре  $100.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  при постоянном перемешивании. Объем раствора NaOH  $20\text{ см}^3$ , масса хитина 0.5 г. Начало реакции фиксировали с момента смешивания нагретых отдельно друг от друга до  $100.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$  порошкообразного хитина и концентрированного раствора NaOH. Реакцию прерывали быстрым переносом реакционной смеси в избыток (1 : 15 об./об.) охлажденного до  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  96%-ного этилового спирта. Осадок центрифугировали и промывали 80%-ным этиловым спиртом до нейтрального pH. Полученный хитозан сушили в сушильном шкафу при температуре  $60 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Концентрация NaOH была 40, 45, 50, 55 и 60%. Для получения растворов с концентрацией более

50% в раствор NaOH после нагревания его до  $100^\circ\text{C}$  при перемешивании добавляли расчетное количество кристаллического NaOH, после полного растворения щелочи раствор смешивали с хитином.

СД определяли методом ИК-спектроскопии по методике, описанной в работе [16]. ИК-спектры снимали на Фурье ИК-спектрофотометре IRTracer 100 (“Shimadzu Corp.”, Япония) в диапазоне  $700\text{--}2000\text{ см}^{-1}$ . СД (%) рассчитывали по формуле:

$$\text{СД} = (0.7568 - A_{1560}/A_{1079})/0.069,$$

где  $A_{1560}$  и  $A_{1079}$  – оптическая плотность при  $1560$  и  $1070\text{ см}^{-1}$ ; 0.7568 и 0.069 – эмпирические коэффициенты, взятые из [16].

Концентрацию ацетамидных групп ( $C_A$ , моль/дм<sup>3</sup>) в реакционной смеси рассчитывали по формуле:

$$C_A = (100 - \text{СД})m/(100M_A V),$$

где СД – степень деацетилирования, %;  $m$  – масса навески хитина, г;  $M_A$  – молярная масса ацетилированного звена хитина, г/моль;  $V$  – объем раствора, дм<sup>3</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что кинетическая кривая реакции деацетилирования хитина состоит из двух участков: первый – быстрое деацетилирование до 70–80% за 1–1.5 ч, и второй – медленное деацетилирование до 85–90% в течение нескольких часов [11, 12, 17]. До настоящего времени основным фактором, определяющим такую кинетику реакции, считают наличие кристаллических областей в хитине, в которых скорость деацетилирования очень низкая из-за плотной упаковки молекул и трудности проникновения внутрь реакционных частиц – гидроксид-ионов [18]. Существуют другие гипотезы, объясняющие снижение скорости деацетилирования: изменение морфологии частично деацетилированного хитина при промывках, существование обратной реакции ацетилирования, снижение концентрации щелочи в процессе деацетилирования, влияние пористости частиц хитина на диффузию гидроксид-ионов и продуктов реакции, а также влияние сольватации или гидратации реагирующих частиц на их взаимодействие с хитином [12]. На основании данных литературы и собственных результатов нами был сделан вывод, что основным фактором, определяющим снижение скорости деацетилирования на втором участке кинетической кривой, является не степень кристалличности хитина, а особенности химиче-

ской реакции в концентрированных растворах электролитов.

Замедление кинетики реакции деацетилирования наблюдалось и при гомогенном деацетилировании хитина [18].

Ранее в работах [19–21] было выдвинуто предположение о том, что решающую роль в гетерогенном щелочном деацетилировании хитина играет гидратация ионов щелочи – гидроксид-ионов и макромолекул хитина/хитозана. Изучение кинетики реакции щелочного деацетилирования хитина позволило сделать вывод о существовании двух параллельных процессов, один из которых ускоряет деацетилирование, другой вызывает замедление реакции. Предложенный механизм состоит из реакции взаимодействия гидроксид-ионов с разной степенью гидратации и молекулы хитина и реакции гидратации молекулы хитина, которая замедляет процесс деацетилирования.

На участке быстрого деацетилирования кинетической кривой скорость деацетилирования резко росла с увеличением концентрации щелочи и уменьшением степени гидратации гидроксид-ионов [21]. Реакция деацетилирования началась при концентрации щелочи около 20%. Этот процесс может быть описан с точки зрения теории существования границы полной гидратации (ГПГ) ионов электролита в воде, при которой все молекулы воды связаны и входят в состав первичной гидратной оболочки растворенных ионов [22]. До ГПГ реакция деацетилирования практически не происходит. После ГПГ, когда гидратная оболочка гидроксид-ионов становится неполной, их активность начинает проявляться в реакции с ацетамидной связью хитина. По всей видимости, реакция деацетилирования начинается при переходе через ГПГ, когда количества молекул воды недостаточно для построения полных гидратных оболочек и в реакции деацетилирования уже не участвуют свободные молекулы воды. В соответствии с механизмом реакции нуклеофильными частицами, атакующими ацетамидную связь в этих условиях, являются гидроксид-ионы. Реакционная способность гидроксид-ионов растет с уменьшением степени гидратации при изменении концентрации щелочи от 20 до 50% [21].

Другой причиной, вызывающей уменьшение скорости реакции на участке быстрого деацетилирования кинетической кривой, является гидратация молекулы хитина. Ранее было установлено, что гидратная оболочка влажного хитина вызывала снижение скорости деацетилирования хитина [19].

В настоящем исследовании получены кинетические кривые деацетилирования хитина при концентрациях NaOH от 40 до 60% и времени деацетилирования до 480 мин (рис. 1).

Для оценки скорости реакции деацетилирования были построены кинетические кривые изме-

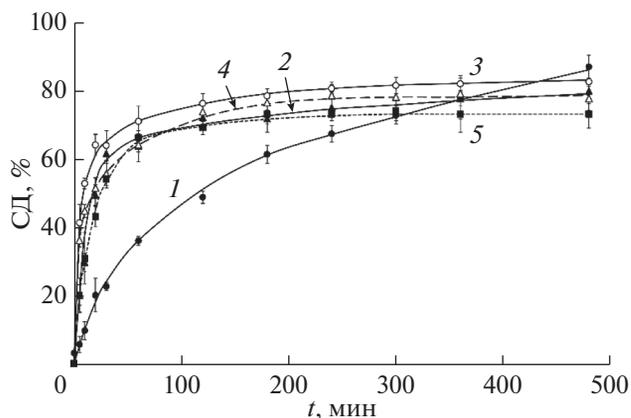


Рис. 1. Кинетические кривые деацетилирования хитина (СД, %) при концентрации NaOH (%): 1 – 40, 2 – 45, 3 – 50, 4 – 55, 5 – 60.

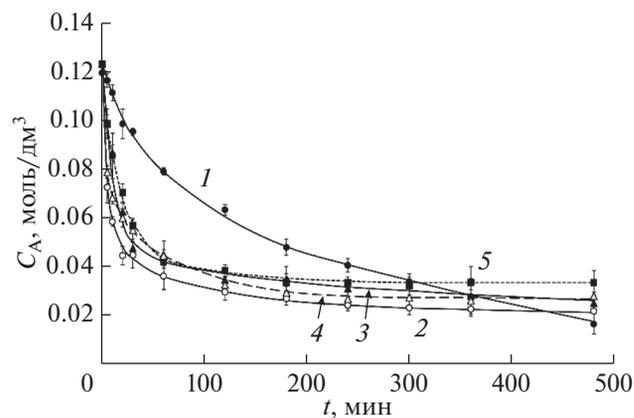
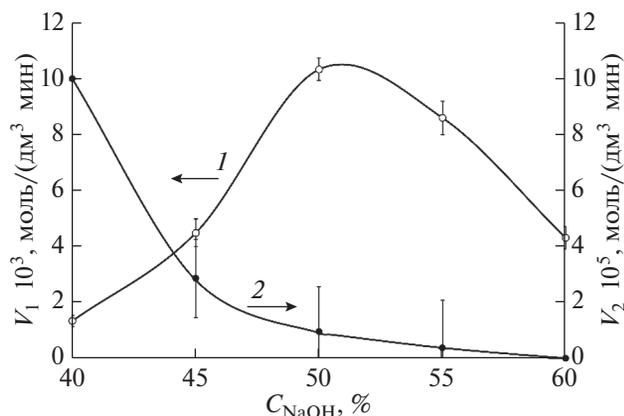


Рис. 2. Кинетические кривые изменения концентрации ацетамидной группы хитина при деацетилировании в растворе NaOH с концентрацией (%): 1 – 40, 2 – 45, 3 – 50, 4 – 55, 5 – 60.

нения концентрации ацетамидных звеньев хитина/хитозана в моль/дм<sup>3</sup> (рис. 2).

Для участка быстрого деацетилирования кинетической кривой (0–90 мин) были рассчитаны начальные скорости реакции деацетилирования по тангенсу угла наклона касательной к кинетической кривой в нулевой момент времени. Скорости реакции деацетилирования на участке медленного деацетилирования (120–480 мин) были рассчитаны путем линейной аппроксимации кинетических кривых в диапазоне от 240 до 480 мин. Результаты изучения влияния концентрации щелочи на скорость реакции деацетилирования на обоих участках кинетической кривой приведены на рис. 3.

Ранее было показано, что скорость реакции на участке быстрого деацетилирования кинетиче-



**Рис. 3.** Влияние концентрации щелочи ( $C$ , %) на скорость реакции деацетилирования на участках кинетической кривой быстрого (1) и медленного деацетилирования (2).

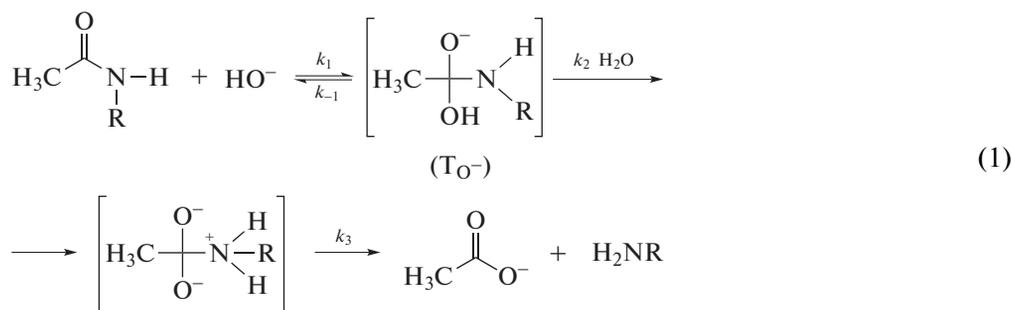
ской кривой при увеличении концентрации щелочи до 50% растет [21]. В настоящей работе мы установили, что при концентрации щелочи более 50% скорость реакции замедлялась, а при концентрации щелочи 60% снижалась до значения  $V_1 = 4.31 \pm 0.4 \times 10^{-3}$  моль/(дм<sup>3</sup> · мин) (рис. 3, кривая 1). Это свидетельствовало о влиянии на механизм реакции деацетилирования процесса ассоциации катионов и анионов щелочи при их высокой концентрации, что приводило к уменьшению содержания в реакционной смеси свободных гидроксид-ионов.

На участке медленного деацетилирования кинетической кривой при увеличении концентрации щелочи от 40 до 60% скорость реакции снижалась и при концентрации щелочи 60% реакция останавливалась:  $V_2 = (0.00 \pm 1.2) \times 10^{-5}$  моль/(дм<sup>3</sup> · мин) (рис. 3, кривая 2). Следует отметить, что при концентрации щелочи выше 50% уменьшалась не

только скорость реакции деацетилирования но и максимально достигаемая СД на этом участке кинетической кривой (рис. 1).

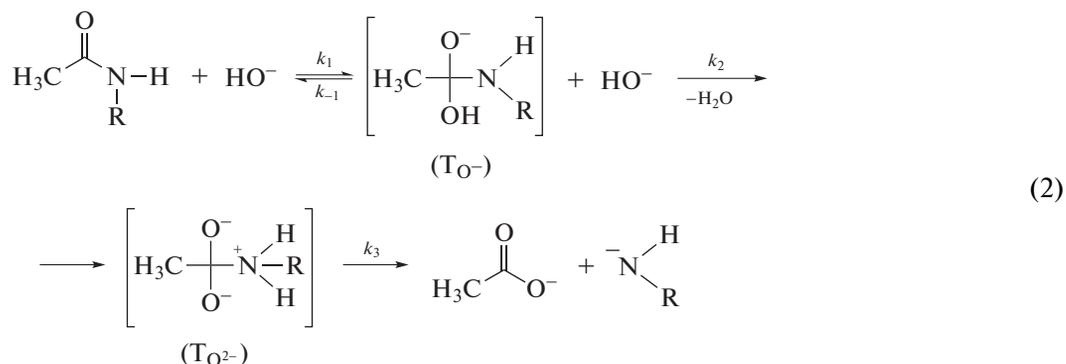
Ранее было высказано предположение, об ингибирующем действии воды, образующейся при протекании реакции деацетилирования хитина [19]. Вода вызывает гидратацию макромолекул полисахарида, что приводит к снижению скорости деацетилирования. Однако не было дано объяснения, почему при большой концентрации щелочи (55–60%), когда количества воды, участвующей в процессе гидратации значительно меньше, чем в разбавленных растворах, скорость деацетилирования на участке медленного деацетилирования кинетической кривой замедляется. Для ответа на этот вопрос рассмотрим механизм реакции щелочного гидролиза (расщепления) ацетамидной связи.

Известно, что реакция щелочного гидролиза ацетамидных связей является реакцией бимолекулярного нуклеофильного замещения второго порядка  $S_N2$ , при котором сильный нуклеофил гидроксид-ион атакует ацетамидную связь [23]. В результате суммарной реакции деацетилирования вода не образуется и не расходуется. В растворах щелочи при атаке амидного углерода гидроксид-ионом (условно “первый гидроксид-ион”) образуется анионный тетраэдрический интермедиат ( $T_{O^-}$ ), который может или превратиться в исходное соединение, или распасться до продуктов гидролиза. Пути распада интермедиата ( $T_{O^-}$ ) могут включать его взаимодействие с разными формами, находящимися в растворе, осуществляющими перенос протона от  $-OH^-$  к ацетамидной связи  $-NHR$ . В разбавленных растворах в качестве переносчика протона постулируется вода (схема 1) [23].

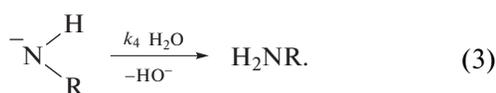


При высокой концентрации щелочи увеличивается вероятность отрыва протона  $\text{H}^+$  вторым гидроксид-ионом с образованием молекулы воды и второго интермедиата ( $T_{O_2^-}$ ), который затем

распадается с образованием ацетат-иона и амид-иона. Расщепление ацетамидной связи в концентрированном растворе щелочи может быть изображено схемой (2), где  $\text{R}$  – остаток молекулы хитина.



В соответствии с этим механизмом полученный амид-ион  $-\text{NHR}^-$  отнимает протон  $\text{H}^+$  у молекулы воды с образованием молекулы хитозана по схеме (3) [24]:



В концентрированной щелочи при отсутствии “свободной воды” амид-ион  $-\text{NHR}^-$ , являясь более сильным нуклеофилом, чем гидроксид-ион, отнимает  $\text{H}^+$  у молекулы воды, входящей в гидратную оболочку гидроксид-иона.

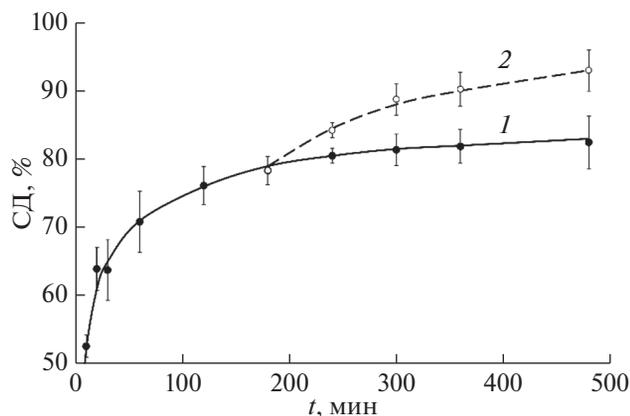
Вероятно, уменьшение скорости реакции деацетилирования на участке медленного деацетилирования кинетической кривой при увеличении концентрации щелочи до 60% может быть следствием образования амидного аниона хитина  $\text{RHN}^-$ , который стабилизируется в высоко концентрированном растворе щелочи. В этом случае на деацетилированных звеньях хитина накапливается избыточный отрицательный заряд, который отталкивает гидроксид-ионы, что и приводит к снижению скорости реакции деацетилирования. Если этот анион будет достаточно стабилен, то реакция деацетилирования может остановиться (об этом свидетельствует изменение наклона участка медленного деацетилирования кинетической кривой на рис. 1 при увеличении концентрации  $\text{NaOH}$ ). При концентрации щелочи менее 50% в растворе происходит нейтрализация заряда аниона хитина за счет переноса протона от молекулы воды с образованием нейтральной молекулы хитозана и гидроксид-иона. При этом отрицательный заряд на молекуле хитина уменьшается, а скорость реакции деацетилирования на участке медленного деацетилирования кинетической кривой увеличивается. При высокой концентрации щелочи “свободной воды” практически нет, и анион хитозана должен отнять молекулу воды у гидратированных ионов электролита. При увеличении концентрации ще-

лочи, то есть при уменьшении степени гидратации ее ионов, энергия связи ионов щелочи с молекулами воды увеличивается. Вероятность отрыва молекулы воды анионом хитозана снижается, поэтому время жизни “квазистабильного” аниона хитозана увеличивается.

Влияние амид-аниона на реакцию деацетилирования может заключаться в следующем. Так как реакция деацетилирования осуществляется в гетерогенных условиях, молекулы хитина находятся в упорядоченном состоянии, за счет образования между ними водородных связей [25]. Отрицательный заряд на амид-ионе одной линейной молекулы может вступить во взаимодействие с атомом углерода в ацетамидной группе соседней молекулы, на котором существует частичный положительный заряд. Величина отрицательного заряда на атоме азота амидной группы одной молекулы снижается, а положительный заряд на атоме углероде ацетамидной группы второй молекулы частично нейтрализуется, что приводит к уменьшению нуклеофильности амид-иона первой молекулы и электрофильности атома углерода ацетамидной группы второй молекулы полисахарида. Вследствие этого снижается вероятность реакции амид-иона с водой и скорость нуклеофильной реакции гидроксид-иона по ацетамидной связи. В целом это приводит к замедлению скорости и остановке реакции деацетилирования.

При промывке водой амид-ион переходит в нейтральную форму и его воздействие на ацетамидную группу соседней молекулы прекращается.

Для подтверждения этой гипотезы было изучено влияние добавления воды на кинетику реакции деацетилирования. Воду добавляли в реакционную смесь хитина и 50%-ного  $\text{NaOH}$  до концентрации  $\text{NaOH}$  40%, через 3 ч после начала реакции, когда кинетика деацетилирования вышла на “плато” участка медленного деацетилирования кинетической кривой (рис. 4, кривая 1). Из данных, приведенных на рис. 4, следует, что добавление воды приводит к увеличению скорости реакции и СД (рис. 4, кривая 2). По-видимому, добавление воды в 50%-ный раствор щелочи до концентрации



**Рис. 4.** Кинетическая кривая деацетилирования хитина в 50%-ном растворе NaOH при 100°C без добавления воды (1) и с добавлением воды (2) через 3 ч после начала реакции до концентрации NaOH – 40%.

NaOH 40% приводит к исчезновению образующегося аниона хитозана в соответствии с реакцией (3), что дает возможность дальнейшему протеканию реакции деацетилирования. Увеличение скорости деацетилирования в условиях эксперимента на этом участке кинетической кривой (рис. 4, кривая 2) может быть объяснено тем, что при увеличении степени гидратации гидроксид-ионов энергия гидратации снижалась, что приводило к увеличению вероятности отрыва части молекул воды анионом хитозана для завершения реакции деацетилирования.

На основании полученных результатов сделан вывод о том, что основную роль в гетерогенном деацетилировании хитина играют эффекты гидратации макромолекул полисахарида и гидроксид-ионов щелочи. На участке быстрого деацетилирования кинетической кривой гидратация гидроксид-ионов и макромолекул хитина ингибирует реакцию деацетилирования, на участке медленного деацетилирования процесс гидратации приводит к увеличению скорости реакции деацетилирования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sustainable Agriculture Reviews 36. Chitin and Chitosan: Applications in Food, Agriculture, Pharmacy, Medicine and Wastewater Treatment. /Eds. G. Crini and E. Lichtfouse. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2019. 432 p.
- Elnashar M. Bio-applications of Chitosan // Handbook of Chitosan Research and Applications. /Ed G. Richard Mackay and Jennifer M. Tait. N.Y.: Nova Science Publishers, 2012. P. 139–162.
- Cadaval T.R.S., Camara A.S., Dotto G.L., Pinto L.A. de A. // Desalin. Water Treat. 2013. V. 51. № 40–42. P. 7690–7699. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.778797>
- Wang W., Xu D. // Int. J. Biol. Macromol. 1994. V. 16. № 3. P. 149–152. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(94\)90042-6](https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90042-6)
- Younes I., Sellimi S., Rinaudo M., Jellouli K., Nasri M. // Int. J. Food Microbiol. 2014. V. 185. P. 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029>
- Wenling C., Duohui J., Jiamou L., Yandao G., Nanming Z., Xiufang Z. // J. Biomater. Appl. 2005. V. 20. № 2. P. 157–177. <https://doi.org/10.1177/0885328205049897>
- Chen R.H., Hua H.D. // J. Appl. Polym. Sci. 1996. V. 61. № 5. P. 749–754. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960801\)61:5<749::AID-APP5>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960801)61:5<749::AID-APP5>3.0.CO;2-O)
- Varum K.M., Ottoy M.H., Smidrod O. // Carbohydr. Polym. 1994. V. 25. № 2. P. 65–70. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90140-6](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90140-6)
- Kurita K., Kaji Y., Mori T., Nishiyama Y. // Carbohydr. Polym. 2000. V. 42. № 1. P. 19–21. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00127-7)
- Zhang H., Neau S.H. // Biomaterials. 2001. V. 22. № 12. P. 1653–1658. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00326-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00326-4)
- Chang K.L.B., Tsai G., Lee J., Fu W.R. // Carbohydr. Res. 1997. V. 303. № 3. P. 327–332. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00179-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00179-1)
- Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Долгопятова Н.В. Химические основы технологии получения хитина и его производных из панциря ракообразных. СПб: ГИОРД, 2012. 208 с.
- Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S. // J. Appl. Polym. Sci. 1983. V. 28. № 6. P. 1909–1917. <https://doi.org/10.1002/app.1983.070280607>
- Younes I., Ghorbel-Bellaaj O., Chaabouni M., Rinaudo M., Souard F., Vanhaverbeke C., Jellouli K., Nasri M. // Int. J. Biol. Macromol. 2014. V. 70. P. 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.051>
- Galed G., Diaz E., Goycoolea F.M., Heras A. // Nat. Prod. Commun. 2008. V. 3. № 4. P. 543–550. <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300414>
- Shigemasa Y., Matsuura H., Sashiwa H., Saimoto H. // Int. J. Biol. Macromol. 1996. V. 18. № 3. P. 237–242. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)01079-3](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)01079-3)
- Новиков В.Ю., Орлова Т.А., Воронина И.Э. // Известия вузов. Пищевая технология. 1990. № 5. С. 64–67.
- Kurita K., Sannan T., Iwakura Y. // Makromol. Chem. 1977. V. 178. № 12. P. 3197–3202. <https://doi.org/10.1002/macp.1977.021781203>
- Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Кучина Ю.А., Долгопятова Н.В., Черкун Ю.А. // Вестник МГТУ. 2017. Т. 20. № 3. С. 515–525. <https://doi.org/10.21443/1560-9278-2017-20-3-515-525>
- Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Кучина Ю.А., Князева А.И., Кузнецов В.Я. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 3(1). С. 76–78.

21. Новиков В.Ю., Коновалова И.Н., Кучина Ю.А., Долгопятова Н.В., Черкун Ю.А. // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. 2018. № 3(3). С. 80–84.  
<https://doi.org/10.31040/2222-8349-2018-2-3-60-63>
22. Мищенко К.П., Полторацкий Г.М. Термодинамика и строение водных и неводных растворов электролитов. Л.: Химия, 1976. 328 с.
23. Чаллис Б.С., Чаллис Дж.А. // В кн. Общая органическая химия. Карбоновые кислоты и их производные. Соединения фосфора. Т. 4. /Ред. О. И. Сазерленд. Пер. с англ. М.: Химия, 1983. С. 388–356.
24. Brown R.S. // In “The Amide Linkage. Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science”. / Ed. by A. Greenberg, C. M. Breneman, J. F. Liebman. Hoboken. New Jersey: John Wiley and Sons, 2003. P. 85–114.
25. Roberts G.A.F. Chitin Chemistry. Basingstoke, London: The Macmillan Press Ltd., 1992. 368 p.

## The Mechanism of Chitin and Chitosan Deacetylation during Long-Term Alkaline Treatment

V. Yu. Novikov<sup>a, b, \*</sup>, I. N. Kononova<sup>b</sup>, and N. V. Dolgopyatova<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Polar Branch of Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (Knipovich Polar Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography), Murmansk, 183038 Russia

<sup>b</sup> The Murmansk State Technical University (MSTU), Murmansk, 183010 Russia

\*e-mail: nowitaly@yandex.ru

The deacetylation of crab chitin in solutions of sodium hydroxide NaOH during the preparation of chitosan was investigated, assumptions about the reaction mechanism in two parts of the kinetic curve corresponding to fast and slow deacetylation were made. Rapid deacetylation is associated with the attack by hydroxide ions ( $\text{OH}^-$ ) on acetamide bonds of chitin. The deacetylation reaction begins at the full hydration boundary of  $\text{OH}^-$  ions at NaOH concentration about 20% and its rate increases with increase in the alkali concentration. At NaOH concentration above 50% the rate of rapid deacetylation decreased, apparently due to a decrease in hydroxide ion concentration as a result of the ionic association of  $\text{Na}^+$  and  $\text{OH}^-$ . With slow deacetylation, the reaction rate decreased with an increase in the alkali concentration, and deacetylation stopped at NaOH concentration of 60%. Probably, the main reason for the termination of the reaction is the formation of kinetically stable chitosan anion in the reaction of second-order bimolecular nucleophilic substitution  $S_N2$  with the participation of two hydroxide ions.

**Keywords:** chitin, chitosan, deacetylation, hydration, kinetics, reaction mechanism

УДК 577.11: 615.076

## ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПОЛИУРЕТАНОВЫХ ПЛАСТИН, МОДИФИЦИРОВАННЫХ КВАТЕРНИЗИРОВАННЫМ ХИТОЗАНОМ И ГЕПАРИНОМ

© 2022 г. Н. Н. Дрозд<sup>1</sup>, \*, А. П. Луньков<sup>2</sup>, Б. Ц. Шагдарова<sup>2</sup>, \*\*, Ю. В. Жуйкова<sup>2</sup>, А. В. Ильина<sup>2</sup>, В. П. Варламов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125167 Россия

<sup>2</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: nndrozd@mail.ru

\*\*e-mail: shagdarova.bal@gmail.com

Поступила в редакцию 20.08.2021 г.

После доработки 25.10.2021 г.

Принята к публикации 05.11.2021 г.

Для получения модифицированных полиуретановых (ПУ) пластин на их поверхность послойно наносили кватернизированный хитозан (**КватХит**; степень замещения 50%, степень дезацетилирования 87%) и нефракционированный гепарин (**НФГ**). Рельеф поверхности пластин исследовали с помощью АСМ. После обработки значительно увеличивались среднеквадратичная шероховатость, высота неровностей профиля ПУ пластин. Величина контактного угла модифицированных ПУ пластин снижалась с  $86.1 \pm 11.3^\circ$  до  $63.2 \pm 3.68^\circ$ . Для оценки *in vitro* устойчивости ПУ пластин к появлению сгустков крови на поверхности (тромборезистентность, **ТРЗ**) использовали кровь доноров и тест на время рекальцификации крови. При инкубации модифицированных ПУ пластин с кровью в течение 20–180 мин ТРЗ достигала  $78.43 \pm 4.02$ – $88.94 \pm 1.98\%$ . Время рекальцификации крови человека, содержащей ПУ пластины с покрытием КватХит – НФГ (20 мин –  $483 \pm 22.64$  с и 40 мин –  $576.5 \pm 24.64$  с), достоверно отличалось от времени рекальцификации крови человека, содержащей ПУ пластины без покрытия (20 мин –  $257.5 \pm 12.84$  с и 40 мин –  $273.3 \pm 16.6$  с). Таким образом, послойная модификация ПУ пластин КватХит и НФГ приводила к высокой устойчивости в отношении появления сгустков крови на поверхности.

**Ключевые слова:** полиуретановая пластина, кватернизированный хитозан, нефракционированный гепарин, послойная модификация, тромборезистентность

**DOI:** 10.31857/S0555109922020040

В результате контакта с кровью таких медицинских устройств, как дренажные трубки, сосудистые стенты и катетеры, протезы кровеносных сосудов, оборудование для систем искусственного или вспомогательного кровообращения, искусственные клапаны сердца, возможна активация плазменного и клеточного гемостаза, что может привести к появлению фибриновых сгустков крови (тромбов) на поверхности приспособлений [1–3]. Для снижения такой вероятности поверхности материалов медицинских устройств (на основе полимеров, сплавов, металлов, керамических материалов, цементов, смол и т.д.) модифицируют [4, 5]. Стратегии модификации материалов устойчивых к появлению тромбов (тромборезистентность) включают изменения химического состава и морфологии поверхности (влияющих на заряд, гидрофобность/гидрофильность, профиль поверхности, пористость), а также иммобилизацию антикоагулянтов (лекарственные средства,

препятствующие появлению сгустков крови) или высвобождение с поверхности соединений с антитромботической активностью (наряду с антикоагулянтами, это могут быть и антиагреганты) [5–7].

Используемые в таких целях антикоагулянты, полисахарид гликозаминогликан нефракционированный гепарин (**НФГ**), прямой ингибитор тромбина бивалирудин, комплекс гепарина с антитромбином (плазменный ингибитор сериновых протеиназ свертывающей системы крови), ингибитор кукурузного трипсина [5, 8–10]. Разнообразие медицинских устройств с активным покрытием НФГ представлено рядом компаний – производителей [11]. Механизм антикоагулянтного действия НФГ связан с активацией плазменного ингибитора сериновых протеиназ свертывающей системы крови – антитромбина [12]. Активация факторов коагуляции приводит к наработке фибрина и возможному появлению тромбов, а активация ингибитора факторов коагуляции сни-

жает вероятность развития тромбоза. НФГ на поверхности устройств действует как катализатор и не расходуется [11, 13].

Методы иммобилизации гепарина на поверхности материала (полимеры, металлы, сплавы) могут быть различны. Возможно соединение через промежуточное вещество, через активацию, простая инкубация, обработка плазмой и облучение или комбинация методов [4, 5].

В последние годы возросло число публикаций, в которых описано улучшение гемосовместимости и тромборезистентности поверхностей, контактирующих с кровью медицинских приспособлений, за счет включения полисахаридов (гепарин, хитозан, целлюлоза, крахмал), а также моноакрилата полиэтиленгликоля, кластера фосфата кальция, оксида графена и нанопластин графена, фиброина шелка, N-винил-2-пирролидона, урокановой кислоты, композиции поливинилового спирта/цирконийоксинитрата, гиалуроновой кислоты, фуллеренолов [5, 14, 15]. Выбор полисахаридов связывают с широкой распространенностью, биосовместимостью и отсутствием токсичности.

Для достижения гемосовместимости нередко используют послойное нанесение на поверхность материала гепарина или соединений с антикоагулянтной активностью, чередуя с каким-либо другим соединением. В работе [16] для снижения активации тромбоцитов и скорости гемолиза магниевое сплава, перспективного для сердечно-сосудистого стента, модифицировали поверхность комбинируя химическую обработку с последующим послойным нанесением функционализованного хитозаном оксида графена и гепарина. Авторы работы [17] предложили нетоксичную пленку на основе поли-L-молочной кислоты, часто используемую для изготовления биорезорбируемых сосудистых каркасов, с отличной гемосовместимостью, которая достигалась путем нанесения слоев сульфатированного полисахарида китайского ямса и хитозана со степенью деацетилирования (СД) 95%. Модификация многослойным полиэлектролитом “tanfloc” (гидрофильное, катионное и конденсированное аминок-производное танина)/гепарин поверхности титановых нанотрубок привела к появлению противотромботической активности [18].

Несмотря на достижения науки о структурах и биоматериалах контактирующих с кровью актуальность новых разработок несомненна.

Цель работы – анализ *in vitro* устойчивости поверхности полиуретановых пластин, обработанных слоями кватернизированного хитозана (**КватХит**) и НФГ, к появлению тромбов (тромборезистентность, ТРЗ).

## МЕТОДИКА

В работе был использован коммерческий предварительно обработанный термопластичный поли-

уретан на основе полиэфира Elastollan 1180a50 (ПУ; BASF Polyurethanes GmbH, Германия). Кватернизированный хитозан (**КватХит**) со степенью замещения (СЗ) 50%, полученный на основе хитозана с молекулярной массой (ММ) 200 кДа и СД 87% (“Биопрогресс”, Москва), синтезирован по методике [19]. Нефракционированный гепарин (НФГ; “Белмедпрепараты”, Беларусь). Для активации пластин ПУ использовали 1,6-диизоцианатогексан 98%, дибутилдилаурат олова 95% (“Sigma”, США). Другие используемые химические вещества были аналитического класса.

**Модификация поверхности полиуретана.** Пластины ПУ 1.54 г размером 5 × 5 см, помещали в 100 мл толуола под током азота. Спустя 15 мин, добавляли 5 мл гексаметилендиизоцианата и 0.25 мл дибутилдилаурата олова. Температура реакции 70°C, время реакции 2 ч. По окончании реакции активированную ПУ (**актПУ**) пластину промывали толуолом, высушивали на воздухе 24 ч.

Затем предварительно активированную и высушенную пластину помещали в 1%-ный раствор КватХит с СЗ 50%, растворенного в 1%-ной уксусной кислоте.

**Послойная поверхностная прививка КватХит и НФГ.** Процесс получения первого полиэлектролитного бислоя на гидрофильной предварительно активированной и обработанной КватХит ПУ пластине состоял из нескольких последовательных шагов. Первоначально пластину погружали в 0.5% раствор НФГ, приготовленный в 0.15M NaCl, на 15 мин при 23°C. Обработанную пластину промывали дистиллированной водой трехкратно по 5 мин. После чего пластину погружали в 0.1%-ный раствор КватХит, содержащий 0.15M NaCl, приготовленный в 1%-ной уксусной кислоте, и выдерживали при 23°C 15 мин. Промывали дистиллированной водой трехкратно по 5 мин. Далее процесс нанесения бислоев многократно повторяли ( $n = 9$ ), в результате чего были получены модифицированные ПУ (**мПУ**) пластины. Последний слой поверхности пластины – нефракционированный гепарин.

**ИК-спектроскопия.** Спектры образцов были записаны с использованием методики измерения нарушенного полного внутреннего отражения (**НПВО**) на Фурье-спектрометре Vertex 70 V (“Bruker”, Германия) с использованием аксессуара Pike ATR с алмазным рабочим элементом (“Nicolet”, США); спектры НПВО были усреднены с разрешением 4 см<sup>-1</sup>. Вся необходимая коррекция была сделана с помощью программного пакета Omnic 8 (“Nicolet”, США).

**Атомно-силовая микроскопия.** Исследования рельефа поверхности образцов в нанометровом масштабе проводили с помощью атомно-силового микроскопа NTEGRA Prima (“NT-MDT SI”, Россия) в полуконтактном режиме на воздухе. Сканирование осуществлялось с частотой 0.9–1.50 Гц, с разрешением 512 × 512 точек. Использо-

вали кремниевые кантилеверы серии ETALON HA-NC (“TipsNano”, Россия) с резонансной частотой кантилевера 235(A) и 140(B) кГц, радиусом закругления менее 10 нм, жесткостью 12(A) и 3.5(B) Н/м. Обработку результатов проводили с помощью программ NOVA и ImageAnalysis P9 (“NT-MDT SI”, Россия).

**Оценка гидрофильности пластин.** Измерения производили на цифровом угломере Contact Angle Meter 110 VAC (“Cole-Parmer”, США). Образец фиксировали на предметном стекле. Затем стекло помещали в поле зрения видеокамеры прибора перед источником света. Далее на поверхность образца с помощью микрошприца наносили каплю дистиллированной воды объемом 0.015 мл и измеряли контактный угол между поверхностью и каплей. Контактный угол измеряли не менее чем для 10 капель при температуре 25°C, рассчитывали среднее значение.

**Подготовка крови.** В исследовании применяли кровь из локтевой вены доноров, стабилизированную водным раствором 0.106 М лимоннокислого натрия  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$  (кровь отбирали до метки в пластиковый шприц S-Monovette 5 mL 9NC, (“Sarstedt”, Германия). Все доноры давали письменное информированное согласие на взятие и использование крови в ФГБУ “НМИЦ гематологии” Минздрава России.

**Определение времени рекальцификации крови (ВРК).** Влияние ПУ пластин на время свертывания цельной крови человека в тесте ВРК оценивали в соответствии с методом, описанным в статье [20]. Образцы пластин (0.5 × 0.5 см) помещали в пластиковые пробирки эппендорфы, добавляли 0.5 мл стабилизированной 0.106 М  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$  крови человека. Через 20 и 40 мин (при 37°C) отбирали 0.1 мл крови в пробирку для определения времени свертывания, добавляли 0.1 мл раствор  $\text{CaCl}_2$  (конечная концентрация 0.01 М) и фиксировали время появления фибринового сгустка в секундах на программируемом полуавтоматическом коагулометре АПГ2-01 (Минилаб-701-М, НПО “Эмко”, Россия).

**Влияние ПУ пластин на образование сгустков крови.** Определяли на поверхности ПУ пластин в соответствии с рекомендациями в работе [21] с некоторыми модификациями. Образцы пластин (0.5 × 0.5 см) помещали в пластиковые пробирки. Затем добавляли 0.5 мл стабилизированной 0.106 М  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$  крови человека и активировали свертывание добавлением водного раствора  $\text{CaCl}_2$  (конечная концентрация 0.05 М). Через 20, 40, 60, 120, 180 мин (при 37°C) пластины извлекали, фотографировали и помещали в гемолизирующий раствор на 1 ч (37°C). Затем определяли оптическую плотность раствора, полученного после инкубации с пластинами, при длине волны 545 нм на спектрофотометре SmartSpec Plus (“Bio-Rad”, США) [22]. Тромборезистентность (%) пластин рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ТРЗ} = 100\% - (\text{OD}_0 \times 100\% / \text{OD}_k),$$

где  $\text{OD}_0$  – оптическая плотность раствора, после инкубации с мПУ пластиной;  $\text{OD}_k$  – оптическая плотность раствора, после инкубации с необработанной ПУ пластиной [23].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Biostat и Statistica. Для сравнения ненормально распределенных данных применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Результаты работы представлены средними арифметическими значениями ± стандартные ошибки средних арифметических от 6–12 независимых определений. Статистически значимые отличия рядов данных наблюдали при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первой стадии ПУ пластины были активированы с помощью бифункционального реагента гексаметилендиизоцианата. В результате активации происходило введение активной функциональной группы на поверхности ПУ пластин, способной взаимодействовать с производным хитозана, содержащим свободные аминогруппы.

Затем обработанные КватХит ПУ пластины модифицировали методом “слой на слой” полиэлектролитами – НФГ, КватХит, НФГ.

Модифицированная с помощью диизоцианата ПУ пластина имела характерный пик в ИК-спектре при  $2264 \text{ см}^{-1}$ , соответствующий колебаниям новой NCO-функциональной группы (рис. 1, спектр 2). Дальнейшая обработка водным раствором КватХит привела к исчезновению данного сигнала в результате частичного гидролиза активной функциональной группы и взаимодействия с производным хитозана. Также наблюдали сдвиг и уширение сигнала колебаний O–H в области  $3310 \text{ см}^{-1}$  за счет вклада гидроксильных групп КватХит на поверхности ПУ пластины (рис. 1, спектр 3).

Поверхность полиуретановых пластин до и после модификации исследовали методом атомно-силовой микроскопии, результаты представлены на рис. 2 и в табл. 1. Исходная поверхность ПУ пластины до модификации относительно гладкая, перепад высот составлял около 100 нм, и достигался, преимущественно, за счет наличия характерных крупных борозд на его поверхности.

Рельеф поверхности акт ПУ пластины значительно отличался от исходной, появлялись выступы и впадины (рис. 2б). После обработки изоцианатом как среднеквадратичная шероховатость, так и высота неровностей профиля, значительно увеличивались в 17 и в 8 раз соответственно (табл. 1). АСМ-изображение ПУ пластины после нанесения на активированную поверхность 1 слоя КватХит представлено на рис. 2в. Морфология поверхности была практически аналогична образцу акт ПУ пластины: присутствие выступов и впадин также наблюдалось, но на их поверхности различалась полимерная

**Таблица 1.** Высота профиля и среднеквадратичная шероховатость поверхности ПУ пластин, рассчитанные с помощью АСМ, а также данные по измерению контактного угла

Образец	Перепад высот, нм	Среднеквадратичная шероховатость, нм	Контактный угол, °
ПУ	105.3 ± 11.1	8.3 ± 4.4	86.1 ± 11.3
актПУ	875.8 ± 150.9	143.1 ± 20.7	76.5 ± 9.2
актПУ + 1 слой КватХит	901.6 ± 170.1	160.3 ± 34.6	—
мПУ	760.1 ± 182.2	135.5 ± 40.1	63.2 ± 3.68

**Таблица 2.** Влияние ПУ пластин на время рекальцификации крови человека *in vitro*

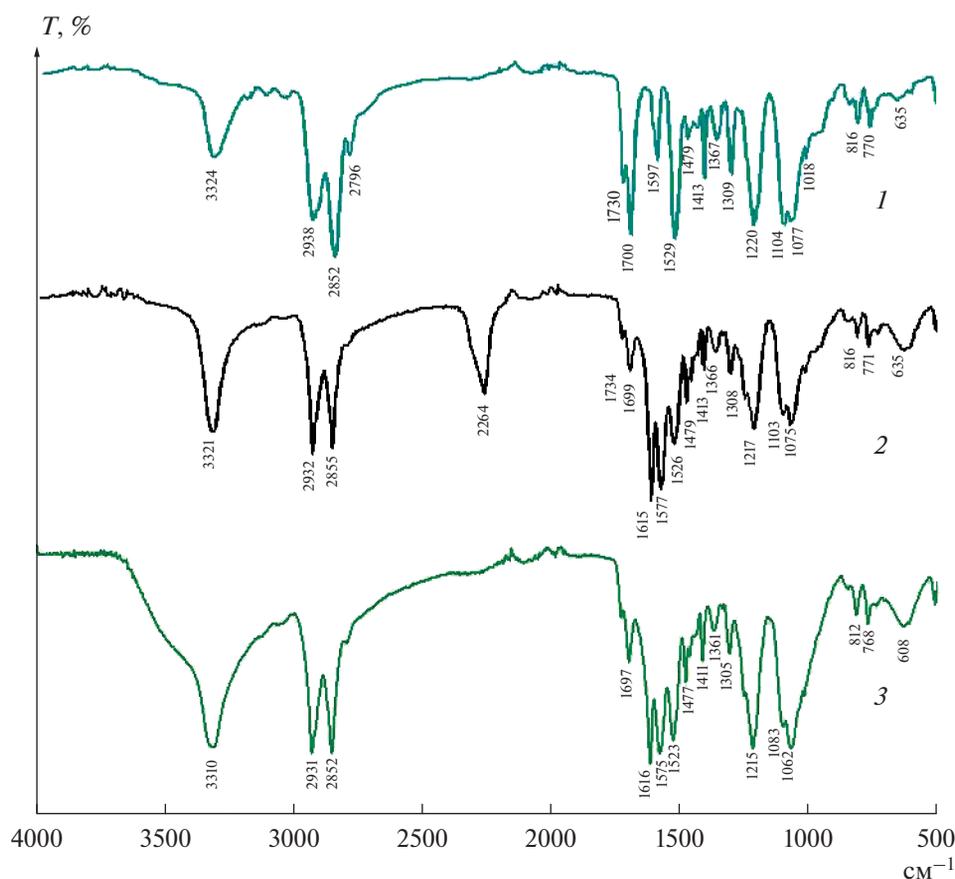
Вариант опыта	Инкубация, мин	Время рекальцификации крови, с
Контроль без ПУ	0	290.20 ± 15.80
Контроль с ПУ	20	257.50 ± 12.84
	40	273.30 ± 16.60
Опыт с мПУ	20	483.00 ± 22.64*
	40	576.50 ± 24.64**

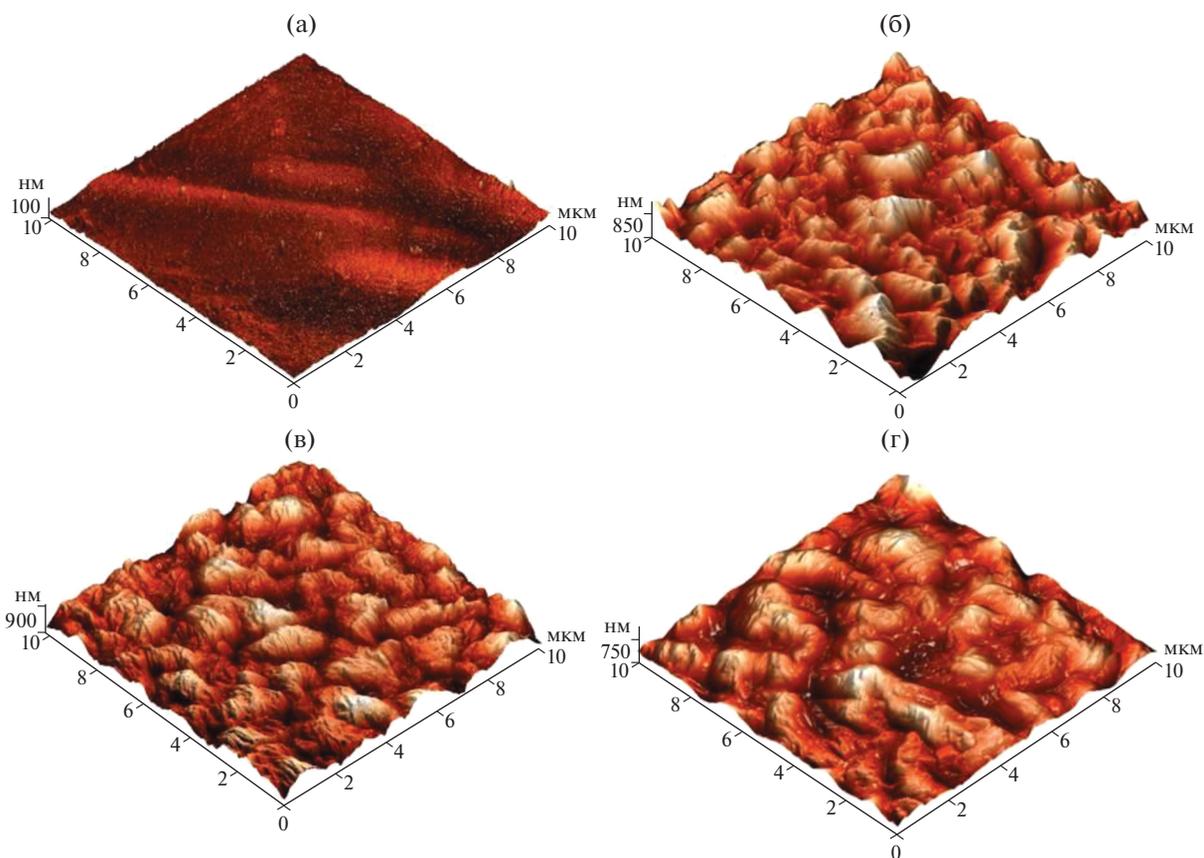
\*  $p < 0.05$ , достоверность различий с показаниями в контроле с ПУ 20 мин инкубации; \*\*  $p < 0.05$ , достоверность различий с показаниями в контроле с ПУ 40 мин инкубации;  $n = 6$ .

пленка КватХит в виде фибриллярных структур, дополнительно усложняющих рельеф пластины и приводящих к увеличению шероховатости на 12%.

Микрофотография образца мПУ пластины после активации изоцианатом и модификации 9 бис-лоями КватХит и НФГ представлена на рис. 2г. Снижение шероховатости по сравнению с образцом с 1 слоем КватХит может быть связано с постепенным заполнением впадин, образовавшихся после активации изоцианатом, и сглаживанием общего рельефа в процессе послойного нанесения полимерной пленки.

Измерения значений контактного угла были использованы для характеристики свойств поверхности ПУ пластины до и после модификации полимерным покрытием. Известно, что гидрофоб-

**Рис. 1.** ИК-спектры полиуретановых пластин. 1 – исходный ПУ; 2 – акт ПУ; 3 – мПУ



**Рис. 2.** АСМ-изображения поверхности пластин: а – исходный ПУ; б – актПУ; в – актПУ + 1 слой КватХит; г – актПУ + 9 бислоев КватХит/НФГ.

**Таблица 3.** Оптическая плотность раствора, полученного после инкубации ПУ пластин с гемолизирующим раствором ( $n = 6-12$ )

Образцы	Время инкубации, мин	OD <sub>545</sub> , отн. ед.	ТРЗ, %
Опыт с мПУ	20	0.0246 ± 0.0023	88.02 ± 1.76
	40	0.0453 ± 0.0051	83.62 ± 2.06 P vs 20 мин = 0.157
	60	0.0544 ± 0.0083	88.94 ± 1.98 P vs 20 мин = 0.665 P vs 40 мин = 0,046
	120	0.0738 ± 0.0109	78.43 ± 4.02 P vs 20 мин = 0.078 P vs 40 мин = 0.544 P vs 60 мин = 0.069
	180	0.0899 ± 0.0162	85.22 ± 1.06 P vs 20 мин = 0.426 P vs 40 мин = 0.888 P vs 60 мин = 0.147 P vs 120 мин = 0.426
Контроль с ПУ	20	0.3400 ± 0.0505	–
	40	0.2563 ± 0.0479	–
	60	0.4009 ± 0.0250	–
	120	0.2611 ± 0.0329	–
	180	0.6208 ± 0.1107	–

\* P vs – достоверность различия показаний при инкубации при 20, 40, 60, 120 мин.

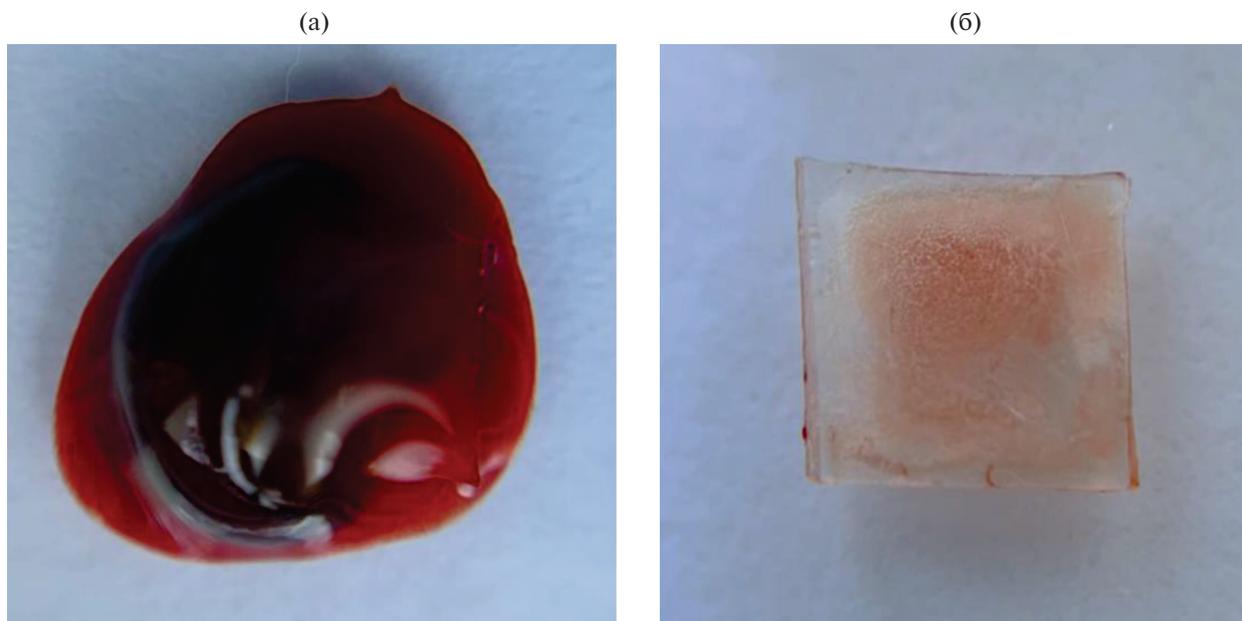


Рис. 3. Изображения фибриновых сгустков крови на пластинах, время инкубации 180 мин: а – ПУ пластина (контроль); б – мПУ пластина (опыт).

ные свойства поверхности материала могут вызывать значительную адгезию тромбоцитов, что может привести к тромбозу [24]. Из данных, представленных в табл. 1 следовало, что снижение величины контактного угла на ПУ пластине, как после активации поверхности изоцианатом, так и в дальнейшем, после нанесения на активированную поверхность 9 полимерных бислоев, может быть связано с наличием функциональных групп  $-\text{OH}$  и  $-\text{NH}_2$  на поверхности модифицированных пластин. Придание материалу гидрофильных свойств должно способствовать повышению гемосовместимости медицинских изделий на его основе.

Поверхности материалов для медицинских устройств не должны провоцировать коагуляцию крови или плазмы [25]. В табл. 2 показано, что инкубация крови с мПУ пластинами ( $0.5 \times 0.5$  см) приводила к достоверному увеличению ( $p < 0.05$ ) времени свертывания в тесте ВРК (20 мин –  $483.00 \pm 22.64$  с и 40 мин –  $576.50 \pm 24.64$  с), по сравнению с контролем – инкубация крови с ПУ пластинами (20 мин –  $257.50 \pm 12.84$  с и 40 мин –  $273.30 \pm 16.60$  с), в 1.88 и 2.11 раза соответственно. Следует отметить, что показания в контроле с ПУ пластинами (20 и 40 мин) достоверно не отличались от показаний в контроле без ПУ пластин.

На рис. 3 (инкубация 180 мин) показаны различия между размерами фибриновых сгустков крови на пластинах ПУ (контроль) и мПУ пластинами (опыт). Ранее нами была обнаружена связь между площадью сгустков крови на фотографиях поверхностей пластин и оптической плотностью растворов, полученных после инкубации пластин в гемолизующем растворе [23]. С увеличением размера сгустка оптическая плотность раствора после ге-

молиза возрастала. При инкубации крови человека с ПУ пластинами 20, 40, 60, 120, 180 мин оптическая плотность раствора, полученного после инкубации пластин с гемолизующим раствором, достигала  $0.2563 \pm 0.0479 - 0.6208 \pm 0.1107$  отн. ед., что было в 3.5–13.8 раз выше, чем после инкубации с мПУ пластинами  $0.0246 \pm 0.0023 - 0.0899 \pm 0.0162$  отн. ед. (табл. 3). То есть, размеры сгустков на ПУ пластинах были больше, чем на мПУ пластинах. Рассчитанная по оптическим плотностям тромбореистентность мПУ пластин достигала  $78.43 \pm 4.02 - 88.94 \pm 1.98\%$ . Достоверных различий между тромбореистентностью мПУ пластин после инкубации 20 и 180 мин не наблюдали.

Таким образом, обработка поверхности полиуретановых пластин слоями КватХит и НФГ приводила к проявлению ими высокой устойчивости к образованию сгустков крови.

Химическая часть работы выполнена в рамках гранта РФФИ 20-33-70168. Биологическая часть работы выполнена в рамках НИР по Государственному заданию ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России РК № АААА-А21-121011290079-5.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jaffer I.H., Weitz J.I. // Acta Biomater. 2019. V. 94. P. 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.021>
2. Avci-Adali M., Ma C., Labarrere C.A., Net C., Kassab G.S., Dabiri A.E. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8:123. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00123>
3. Sukavaneshvar S. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2017. V. 112. P. 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.009>

4. Maitz M.F., Martins M.C.L., Grabow N., Matschegewski C., Huang N., Chaikof E.L., Barbosa M.A., Werner C., Sperling C. // *Acta Biomater.* 2019. V. 94. P. 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.019>
5. Patel H. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2021. V. 32. № 4. P. 237–247. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000001011>
6. Ashcraft M., Douglass M., Chen Y., Handa H. // *Biomater.* 2021. V. 9. № 7. P. 2413–2423. <https://doi.org/10.1039/D0BM02154G>
7. Jin S., Huang J., Chen X., Gu H., Li D., Zhang A., Liu X., Chen H. // *ACS Appl. Bio Mater.* 2020. V. 3. № 1. P. 570–576. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00969>
8. Yau J.W., Stafford A.R., Liao P., Fredenburgh J.C., Roberts R., Brash J.L., Weitz J.I. // *Acta Biomater.* 2012. V. 8. № 11. P. 4092–4100. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.07.019>
9. Yang Y., Li X., Qiu H., Li P., Qi P., Maitz M.F., You T., Shen R., Yang Z., Tian W., Huang N. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 9. P. 7649–7660. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06108>
10. Patent FR. 2016. WO 2016/201202 A1
11. Biran R., Pond D. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 112. P. 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.12.002>
12. Guerrini M., Guglieri S., Beccati D., Torri G., Viskov C., Mourier P. // *Biochem. J.* 2006. V. 399. № 2. P. 191–198. <https://doi.org/10.1042/BJ20060656>
13. Tan J., Cui Y., Zeng Z., Wei L., Li L., Wang H., Hu H., Liu T., Huang N., Chen J., Weng Y. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2020. V. 108. № 6. P. 1295–1304. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36902>
14. Caputo H.E., Straub J.E., Grinstaff M.W. // *Chem. Soc. Rev.* 2019. V. 48. № 8. P. 2338–2365. <https://doi.org/10.1039/C7CS00593H>
15. Kajzer W., Szewczenko J., Kajzer A., Basiaga M., Jaworska J., Jelonek K., Nowińska K., Kaczmarek M., Orłowska A. // *Mater.* 2021. V. 14. № 10. <https://doi.org/10.3390/ma14102551>
16. Gao F., Hu Y., Li G., Liu S., Quan L., Yang Z., Wei Y., Pan C. // *Bioact. Mater.* 2020. V. 5. № 3. P. 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.016>
17. Yu Y., Cui R., Wang X., Yang H., Li H. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 155. P. 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.180>
18. Sabino R.M., Kauk K., Madruga L.Y.C., Kipper M.J., Martins A.F., Popat K.C. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2020. V. 108. № 4. P. 992–1005. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36876>
19. Shagdarova B., Lunkov A., Il'ina A., Varlamov V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 124. P. 994–1001. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.209>
20. Gulliani G.L., Hyun B.H., Litten M.B., Am. J. Clin. Pathol. 1976. V. 65. № 3. P. 390–396. <https://doi.org/10.1093/ajcp/65.3.390>
21. Wang X., Hu L., Li C., Gan L., He M., He X., Tian W., Li M., Xu L., Li Y., Chen Y. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 83. P. 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.052>
22. Dash B.C., Réthoré G., Monaghan M., Fitzgerald K., Gallagher W., Pandit A. // *Biomaterials.* 2010. V. 31. № 32. P. 8188–8197. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.067>
23. Drozd N.N., Shagdarova B.T., Zhuikova Y.V., Il'ina A.V., Vasiliev M.N., Vasilieva T.M., Hein A.M., Varlamov V.P. // *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.* 2019. V. 24. <https://doi.org/10.15259/PCACD.24.001>
24. Obiweluzor F.O., Tiwari A.P., Lee J.H., Batgerel T., Kim J.Y., Lee D., Park C.H., Kim C.S. // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. V. 99. P. 1274–1288. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.054>
25. Gorbet M., Sperling C., Maitz M.F., Siedlecki C.A., Werner C., Sefton M.V. // *Acta Biomater.* 2019. V. 94. P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.020>

## Thromboresistance of Polyurethane Plates Modified with Quaternized Chitosan and Heparin

N. N. Drozd<sup>a,\*</sup>, A. P. Lunkov<sup>b</sup>, B. Ts. Shagdarova<sup>b,\*\*</sup>, Yu. V. Zhuikova<sup>b</sup>, A. V. Il'ina<sup>b</sup>, and V. P. Varlamov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125167 Russia

<sup>b</sup> Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: nndrozd@mail.ru

\*\*e-mail: shagdarova.bal@gmail.com

To obtain modified polyurethane (PU) plates, quaternized chitosan (QuatCh; degree of substitution 50%, degree of deacetylation 87%) and unfractionated heparin (UFH) were applied to their surface in layers. The relief of the surface of the plates was studied using AFM. After processing, the root-mean-square roughness and the height of the unevenness of the PU profile of the plates significantly increased. The value of the contact angle of the modified PU plates decreased from  $86.1 \pm 11.3^\circ$  to  $63.2 \pm 3.68^\circ$ . To assess the in vitro resistance of PU plates to the appearance of blood clots on the surface (thromboresistance, TR), donor blood and a blood recalcification time test were used. When incubating modified PU plates with blood for 20–180 min, the TR reached  $78.43 \pm 4.02$ – $88.94 \pm 1.98\%$ . The time of recalcification of human blood containing PU plates coated with QuatCh – UFH (20 min– $483 \pm 22.64$  s and 40 min– $576.5 \pm 24.64$  s) significantly differed from the time of recalcification of human blood containing PU plates without coating (20 min– $257.5 \pm 12.84$  s and 40 min– $273.3 \pm 16.6$  s). Thus, the layer-by-layer modification of the PU plates of QuatCh and UFH leads to high resistance to the appearance of blood clots on the surface.

**Keywords:** polyurethane plate, quaternized chitosan, unfractionated heparin, layer-by-layer modification, thromboresistance

УДК 633.11:579.23

## ФУНГИЦИДНАЯ И БАКТЕРИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ХИТОЗАНОВ С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ И МЕДНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ИХ ОСНОВЕ

© 2022 г. Э. В. Попова<sup>1, \*</sup>, Н. М. Коваленко<sup>1</sup>, Н. С. Домнина<sup>2</sup><sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608 Россия<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*e-mail: elzavropova@mail.ru

Поступила в редакцию 25.08.2021 г.

После доработки 23.11.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Изучены антибактериальная и антигрибная активности хитозанов с молекулярной массой (ММ) 5, 10, 50, 150 кДа и степенью деацетилирования 85%, а также медных комплексов, полученных на их основе. Установлено, что активность хитозана зависела от ММ хитозана и его концентрации. Показано, что в пределах концентраций 0.02–0.1% антибактериальная и антигрибная активности медных комплексов не зависели от ММ хитозана и была более высокой по сравнению с хитозаном.

**Ключевые слова:** хитозан, медные комплексы хитозана, антибактериальная активность, антигрибная активность

**DOI:** 10.31857/S0555109922030114

Широко распространенный в природе полисахарид хитозан по-прежнему привлекает внимание исследователей благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам и биологической активности, а также полной безопасности для окружающей среды [1–4]. В связи с тем, что хитозан получают специальными методами из разнообразных природных источников, то для него характерна структурная неоднородность по многим параметрам [2]. К ним следует отнести молекулярную массу (ММ), количественное соотношение ацетилированных и деацетилированных звеньев в цепи, а также характер их расположения в полимерной цепи. Именно эти особенности хитозана обуславливают многообразие его биологических свойств, что подтверждается многочисленными исследованиями в этой области [5, 6].

Большинство работ, связанных с изучением механизмов антибактериального и антигрибного действия этого биополимера, свидетельствуют о том, что биоцидная активность хитозана связана с его поликатионной структурой и способностью связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток [5, 7]. Механизм проявления такой активности до сих пор не понятен, однако есть четкие доказательства того, что взаимодействие хитозана и его производных с клеточными мембранами на молекулярном уровне приводит к гибели клеток [8–10]. Это так называемый “антибактериальный эффект” хи-

тозана [8]. Первой мишенью действия хитозанового полимера в случае грамотрицательных бактерий становится липополисахарид, который заряжен отрицательно и входит в состав внешней мембраны. У грамположительных бактерий главной мишенью для хитозана могут быть тейхоевые кислоты, отрицательный заряд которым придают многочисленные остатки фосфорной кислоты. В обоих случаях такое взаимодействие нарушает нормальное функционирование обменных процессов клетки с внешней средой, изменяя проницаемость цитоплазматической мембраны, в результате чего усиливается отток веществ из клетки.

Необходимо отметить, что если некоторые авторы выявляют различия в чувствительности грамотрицательных и грамположительных бактерий к хитозану, то в ряде работ делается вывод, что структурные различия клеточной стенки бактерий не являются определяющим при их взаимодействии с полисахаридом [11].

В работе Ильиной с соавт. [12] утверждается, что антибактериальная активность хитозана в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов может зависеть не только от его молекулярной массы, но и от степени деацетилирования (СД). При тестировании хитозанов с ММ 4 кДа, но с изменяющейся величиной СД (55, 73, 78 и 86%) была установлена тенденция к увеличению уровня гибели клеток по мере уве-

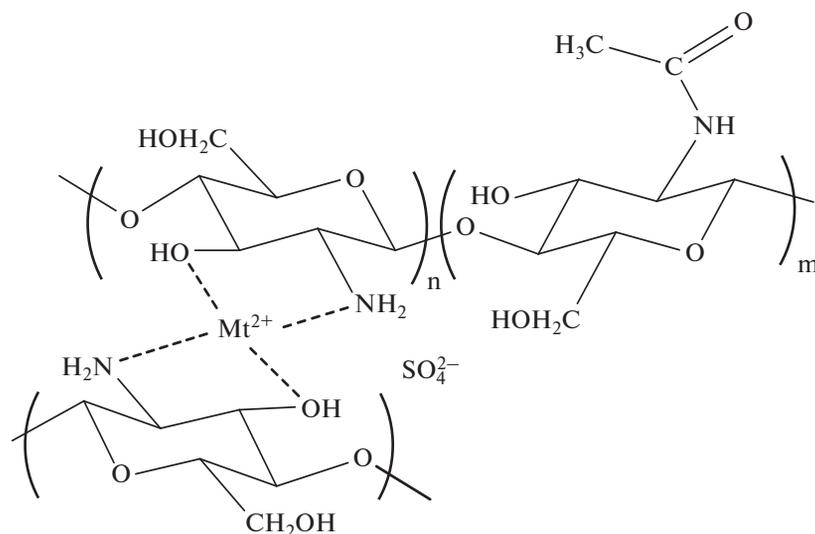


Рис. 1. Структура комплексов хитозан-металл [28].

личения СД полимера. По мнению авторов, высокая концентрация положительных зарядов в цепи хитозана с максимальной СД приводила к образованию наиболее прочной связи с поверхностью клеточной стенки микроорганизмов.

К такому же выводу пришли авторы работы [13] при изучении антибактериальной активности ряда образцов хитозанов, ММ которых изменяли от 2 до 224 кДа и СД с 16 до 84%. Активность образцов оценивали по ингибированию роста и целостности мембран на примере *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*. Авторы пришли к выводу, что хитозаны с высокой СД проявляли повышенную антибактериальную активность [13].

В литературе до сих пор не установлена однозначная корреляция между значением ММ хитозана и его биологическими свойствами [7, 13]. В работе [14] показано, что с увеличением ММ хитозана при воздействии на растущие клетки *Bacillus cereus* антимикробный эффект усиливался в ряду олигосахаридов до образцов с ММ 628 кДа, что объяснялось увеличением количества аминогрупп, способных прочно связываться с поверхностными структурами клетки. Другие исследователи [15] приходят к противоположному выводу – о более высокой антибактериальной активности низкомолекулярных хитозанов. Биоцидное действие этих полимеров авторы связывают с тем, что такие образцы обладают большей проникающей способностью через клеточную стенку бактерий, что нарушает их функционирование, влияя на физиологические процессы, происходящие внутри клеток, что влечет за собой гибель клетки. К такому же выводу пришли авторы [16] при изучении бактерий, таких как *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Установлено, что чем ниже молекулярная масса хито-

зана, тем выше антибактериальный эффект. Молекулы низкомолекулярного хитозана могут связываться с ДНК, проникая в ядро клетки, подавляя синтез мРНК [6]. Анализ влияния различных факторов на антибактериальную активность хитозана представлен в последних обзорах [7, 17].

К настоящему времени установлено, что хитозан имеет прямое фунгистатическое действие, которое зависит от его физико-химических свойств, а также вида микроорганизма [18]. К хитозану чувствительны грибы и оомицеты, содержащие незначительное количество хитозана в клеточных стенках, а зигомицеты, содержащие большое количество хитозана в клеточных стенках, устойчивы к его воздействию. Энтомопатогенные грибы, обладающие высокой хитинолитической активностью, устойчивы к действию хитозана.

Противоречивые данные относительно корреляции между противогрибковой активностью и молекулярной массой хитозана также получены в ряде работ [17, 19–21]. Результаты исследования процесса ингибирования хитозаном десяти растительных патогенных грибов: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Colletotrichum capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica*, *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia solani*, *Helminthosporium oryzae*, *Sphaceloma ampelinum* и *Fusarium graminearum* показали, что полимеры с низкой ММ обладали более высокой степенью ингибирования мицелия, чем высокомолекулярные хитозаны [17, 21]. В работе [19], наоборот, установлено, что с увеличением молекулярной массы растет и антигрибная активность против *Candida albicans*, *Candida krusei* и *Candida glabrata*.

Необходимо добавить, что и вид микроорганизма также определяет их восприимчивость к хитозану с разной молекулярной массой, что по-

казано в работе [20]. Грибы *Puccinia asparagi* и *Fusarium oxysporum* оказались чувствительнее к хитозану с низкой молекулярной массой, тогда как против *Stemphylium solani* более эффективен был хитозан с высокой молекулярной массой.

Также важным фактором проявления противогрибковой активности является степень деацетилирования хитозана: с увеличением СД возрастает и антигрибная активность [22]. Варьирование двух характеристик хитозана (СД и ММ) позволяет найти комбинацию, приводящую к максимальному результату по этому параметру. Вывод, что антигрибная активность больше при высоком значении СД и низкой величине ММ был подтвержден на различных видах патогенов: *Candida albicans* [22], *Aspergillus fumigatus* [23] и *Aspergillus flavus* [24].

Механизм антигрибного действия хитозана по аналогии с бактериями связывают с нарушением структуры клеточной стенки, ведущим к изменению морфологии мицелия, жизнеспособности спор, нарушению целостности грибной цитоплазматической мембраны, что приводит к выходу из клеток цитоплазматического содержимого. Электростатическое взаимодействие положительно заряженных свободных аминогрупп хитозана с отрицательно заряженными фосфолипидами мембран клеток грибов подтверждается его зависимостью от рН, различного для низко- и высокоацетилированного хитозана с одинаковой молекулярной массой и концентрацией в среде [18–24]. В связи с этим хитозаны с большей СД (86–90%) во всех случаях проявляли более сильное фунгистатическое действие. Этот параметр играет решающую роль в адгезии хитозана к клеткам мицелия и спор грибов. Таким образом, можно считать установленным, что любая биологическая активность хитозана в первую очередь определяется наличием положительного заряда на его макромолекулах.

В последние два десятилетия многие исследования были направлены на повышение активности хитозана за счет увеличения плотности положительного заряда, за счет введения в его состав биологически активных веществ, целенаправленно усиливающих его биоцидную активность. С этой точки зрения большой интерес представляет способность хитозана образовывать комплексы с различными металлами, которые, с одной стороны, сами обладают биоцидной активностью и, с другой стороны, могут использоваться растениями в качестве катализаторов биохимических процессов. В последнее время наиболее распространенной стратегией повышения антимикробных свойств хитозана является его использование в сочетании с металлами и их наночастицами [25–27].

Ранее нами [28] были получены комплексы хитозана (ММ = 3–150 кДа) с металлами (Cu, Zn, Fe), показывающие высокую антигрибную ак-

тивность в отношении *F. oxysporum*. Наиболее активными оказались комплексы хитозана с медью.

Цель работы – сравнительное изучение антибактериальной и антигрибной активностей хитозанов с СД 85% и разной ММ, а также медных комплексов, полученных на их основе.

## МЕТОДИКА

Методом окислительной деструкции [29] высокомолекулярного хитозана Хит-150 (ММ = 150 кДа, СД = 85%) получено 3 образца с ММ 5, 10 и 50 кДа, соответственно Хит-5, Хит-10, Хит-50. Значение СД, определенное для всех образцов методом потенциометрического титрования [30], составляло 85%.

На основе полученных образцов синтезированы комплексы хитозана с медью (Хит + Cu), как описано в работе [28]. Для этого 0.5 г хитозана растворяли в 100 мл 4%-ной уксусной кислоты, вносили 0.77 г  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , добавляли раствор щелочи (10%-ный KOH), доводя рН до 5.6. Смесь перемешивали при 20°C в течение 3 ч, затем продукт осаждали ацетоном, центрифугировали, промывали этанолом, фильтровали и высушивали в вакууме. Выход комплекса составлял 60–80% в зависимости от ММ хитозана.

Содержание меди в предварительно минерализованных образцах комплексов хитозана определяли фотометрически на приборе “UV-2600 Shimadzu” (Япония) по известной методике, использованной ранее в работе [28], основанной на взаимодействии ионов Cu с органическим реагентом (пикрамин-эпсилон) с образованием окрашенного комплексного соединения. ИК-спектры хитозана и его комплексов снимали на Фурье-спектрометре “Spectrum BX” (“Perkin Elmer Inc.”, США) в таблетках с KBr.

Получены и испытаны следующие образцы: хитозаны (Хит-5; Хит-10; Хит-50; Хит-150) и медные комплексы на их основе (Хит-5 + Cu; Хит-10 + Cu; Хит-50 + Cu; Хит-150 + Cu).

Во всех экспериментах по оценке биологической активности хитозанов и их комплексов для растворения была использована 0.1%-ная янтарная кислота, не обладающая антимикробной активностью.

Антибактериальную активность образцов хитозана оценивали по их способности подавлять рост культур бактерий, вызывающих заболевания сельскохозяйственных культур: *Bacillus polymyxa* (Prazmowski 1880) Mace 1989 – бактериальная гниль клубней картофеля; *Pseudomonas syringae syringae pv tomato* – пятнистость томата; *Erwinia carotovora* (syn. *Pectobacterium carotovorum*) – вызывает болезни картофеля и др. растений, называемые “черная ножка”.

Тест-культуры получены из коллекций типовых культур ВНИИСХМ и лаборатории микробиометода ВИЗР (Россия). Оценку антимикробной активности образцов хитозана проводили методом диффузии в агар (метод лунок) раствора испытуемого соединения [31]. Метод основан на сравнении ингибирования роста тест-микроорганизма испытуемым раствором хитозана по отношению к контролю (дистиллированная вода) и определении биологической активности по зоне ингибирования роста тест-микроорганизма (радиус зоны ингибирования роста тест-организма в мм).

В стерильные чашки Петри разливали охлажденный до 45°C картофельно-глюкозный агар. После застывания на поверхность агара наносили 0.2 мл суспензии испытуемых бактерий с титром  $10^6$  КОЕ/мл. После посева агара чашки оставляли на 1–2 ч для впитывания инокулюма. Затем на поверхности агара стерильным сверлом делали лунки диаметром 6 мм. В лунки каждой чашки одновременно вносили по 0.2 мл раствора испытуемых образцов в концентрации 0.2% и раствора стандарта. В качестве стандарта служил 0.1%-ный раствор янтарной кислоты. После этого чашки оставляли в течение 1–2 ч при комнатной температуре, а затем помещали в термостат и выдерживали при 25°C в течение 48 ч. Для каждого рабочего раствора измеряли зоны ингибирования роста тест-штамма микроорганизмов в мм (радиус).

Изучение антигрибной активности препаратов проводили методом агаровых блоков [32]. В качестве тест-культур использовали *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *lycopersici* (Sacc.), вызывающего фузариозное увядание томата, *Sclerotinia sclerotiorum*, вызывающего белую гниль огурцов, томата и др. культур, а также *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastu – возбудителя темно бурой пятнистости пшеницы. При тестировании методом блоков в теплую агаризованную среду Чапека вносили растворы испытуемых образцов хитозана и медных комплексов на его основе, рассчитывая конечную концентрацию в среде. После застывания среды на ее поверхности устанавливали агаровые блоки 7-суточной тест-культуры, вырезанные стерильным пробочным сверлом, затем чашки Петри помещали в термостат при 22–25°C. Фунгистатическую активность оценивали по диаметру подавления роста тест-культуры на 5 сут выращивания. Контролем служили чашки со средой Чапека без испытуемых веществ.

Влияние хитозановых образцов на прорастание конидий *C. sativus* проводили также в капле (200 мкл) на предметных стеклах, в темноте при 22°C, во влажной камере в течение 24, 48 и 72 ч. К 0.1 мл 0.05%-ного раствора образца добавляли 0.1 мл суспензии спор аскомицета ( $10^4$ ). Прорастание конидий оценивали микроскопированием, про-

сматривая не менее 100–200 спор в варианте опыта и в контроле (в воде). Частоту прорастания выражали в процентах от общего числа спор, просмотренных в контроле и опыте [33].

Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики (на основе стандартных ошибок средних  $\pm$ SEM). Наименьшая существенная разница (НСР) использовалась для сравнения средних значений при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что благодаря наличию функциональных групп хитозан является хорошим хелатирующим агентом и легко образует комплексы с ионами металлов с переменной валентностью [34]. Для доказательства образования и подтверждения структуры комплексов хитозан-металл, как правило, используют спектральные методы [35].

Ранее было показано [28], что в результате координации между металлом (Cu) и аминными группами хитозана в ИК-спектрах наблюдалось смещение максимумов поглощения валентных и деформационных колебаний NH-связей в сторону низких частот и появлялся максимум при  $1560 \text{ см}^{-1}$ , обусловленный деформационными колебаниями NH-связей в аминных группах хитозана, связанных с металлом. На основании этих данных была предложена структура комплексов хитозан-металл, подтвержденная в последующем другими исследователями [6].

Содержание меди в комплексах, рассчитанное в максимуме поглощения при 551 нм, составило  $10 \pm 1\%$ , что соответствует мольному соотношению медь : хитозан – 1 : 4.

Известно, что механизм действия хитозанов на микроорганизмы связан с нарушением целостности наружной мембраны [5, 10].

С учетом разного строения клеточных стенок бактерий для испытания прямой антибактериальной активности были взяты грамотрицательные (*P. syringae*, *E. carotovora*) и одна грамположительная (*B. polymyxa*) бактерии.

В табл. 1 приведены экспериментальные данные по антигрибной и антибактериальной активности хитозанов и медных комплексов, полученных на их основе.

Следует отметить, что большинство исследователей при изучении антибактериальной и антигрибной активности хитозана в качестве растворителя используют 0.2%-ную соляную или уксусную кислоты [36], которые сами по себе обладают антимикробной активностью. В данной работе для растворения образцов хитозанов использовали водный раствор янтарной кислоты, не влияющую на линейный рост тест-культур (см. табл. 1). Показано, что все образцы хитозана обладали высо-

**Таблица 1.** Антигрибная и антибактериальная активности образцов хитозанов и соответствующих комплексов с медью (концентрация 0.2%)

Образец	Ингибирование роста мицелия на 5 сут, %		Диаметр зоны отсутствия роста тест-культур, мм		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	Грам (–)		Грам (+)
			<i>P. syringae</i>	<i>E. carotovora</i>	<i>B. polymyxa</i>
Хит-5	79.6	82.2	0.80	1.5	1.5
Хит-10	83.1	83.3	1.0	1.5	1.5
Хит-50	82.3	82.2	1.5	1.8	1.7
Хит-150	79.1	66.6	0.5	0.7	0.7
Хит-5 + Cu	85.7	83.3	2.5	2.0	1.8
Хит-10 + Cu	87.5	86.6	2.0	2.0	1.5
Хит-50 + Cu	87.5	83.5	3.0	3.3	3.5
Хит-150 + Cu	85.0	78.9	2.5	3.0	2.5
0.1%-ный водный раствор янтарной кислоты	0	0	0	0	0
НСР* ( $p < 0.05$ )	2.2	2.0	0.05	0.1	0.15

\* НСР – наименьшая существенная разница для сравнения средних значений при  $p < 0.05$ .

кой антигрибной активностью, сдерживая рост мицелия гриба *F. oxysporum* на 79.1–83.1%, а *S. sclerotiorum* на 66.6–83.3%. Например, на 5 сут культивирования антигрибная активность хитозанов с ММ 5–50 кДа практически не менялась по отношению к грибу *S. sclerotiorum*, а с увеличением ММ хитозана до 150 кДа снижалась до 66.6%. Как и ожидалось, медные комплексы хитозанов обладали более высокой степенью ингибирования роста мицелия грибов по сравнению с хитозанами.

Из табл. 1 видно, что все образцы хитозана с ММ от 5 до 150 кДа обладали антибактериальной активностью, как по отношению к грамположительным, так грамотрицательным бактериям. Менее чувствительным к действию хитозанов оказался штамм *Pseudomonas syringae*, что, скорее всего, связано с его особенностями.

Модельный опыт по оценке действия хитозана Хит-5 на прорастание конидий *C. sativus* показал, что при концентрации 0.05% на вторые сутки достигался 50%-ный ингибирующий эффект, который постепенно повышался по мере увеличения концентрации полимера (табл. 2).

Результаты оценки антигрибной активности хитозана с разной молекулярной массой в отношении *C. sativus* представлены в табл. 3. Отмечена следующая тенденция: чем меньше ММ, тем в большей степени выражена противогрибковая активность. Закономерным является рост антигрибной активности по мере увеличения концентрации образца. Например, радиальный рост *C. sativus* подавлялся от 58.7 до 68.6% на 5 сут инкубации при увеличении концентрации хитозана Хит-5 с 0.05 до 0.1%. При более низкой концентрации (0.02%) хитозан мог ингибировать только 48.0% радиального роста мицелия гриба на 5 сут инкубации.

Введение меди с образованием комплекса значительно повышало биоцидную активность по сравнению с активностью исходного хитозана, что связано с увеличением положительного заряда хитозана в присутствие ионов металлов. Кроме того, это повышало способность поликаатиона адсорбироваться на отрицательно заряженной поверхности клетки микроба. Из результатов, представленных в табл. 3 видно, что медные комплексы хитозана независимо от его исходных характеристик проявляли высокую антигрибную активность, подавляя рост мицелия гриба *C. sativus* на 85.8–88.6% при концентрации 0.1%. Повышенная антигрибная активность комплексов сохранялась при применении их и в меньших концентрациях. В пределах концентраций 0.02–0.1% биоцидная активность комплексов практически не зависела от величины ММ исходного хитозана. Эта же закономерность выявлена в опыте по оценке влия-

**Таблица 2.** Влияние концентрации хитозана с молекулярной массой 5 кДа (Хит-5) на прорастание конидий *C. sativus* на 2 и 3 сут

Концентрация хитозана, %	Количество проросших конидий <i>C. sativus</i> , %	
	2 сут	3 сут
Контроль (без хитозана)	85	100
0.02	60	80
0.05	55	80
0.1	45	85
0.2	15	70
0.5	10	65
НСР ( $p < 0.05$ )	3.2	3.5

**Таблица 3.** Влияние концентрации образцов хитозана (%) и соответствующих медных комплексов на подавление роста мицелия на 5 сут и прорастание конидий *C. sativus* на 2 сут

Образец	Подавление роста мицелия, %			Количество проросших конидий, на 2 сут, % от контроля*
	концентрация образца, %			
	0.1	0.05	0.02	0.05
Хит-5	68.6	58.7	48.0	70
Хит-10	71.1	55.0	46.2	75
Хит-50	64.3	47.5	43.7	70
Хит-150	61.1	45.3	40.0	70
Хит-5+ Cu	88.6	84.0	70.0	10
Хит-10+ Cu	86.1	83.0	71.1	7
Хит-50+ Cu	85.8	85.2	73.7	5
Хит-150+ Cu	88.0	86.0	75.0	5
НСР ( $p < 0.05$ )	2.3	1.8	2.0	4.6

\* Контроль 100%.

**Таблица 4.** Действие хитозанов и их медных комплексов на прорастание конидий *C. sativus* (концентрация образцов 0.05%)

Образец	Количество проросших конидий <i>C. sativus</i> , %		
	1 сут	2 сут	3 сут
Контроль	60	90	100
Хит-5	10	60	70
Хит-10	15	70	75
Хит-50	10	65	70
Хит-150	15	60	70
Хит-5+ Cu	0	0	10
Хит-10+ Cu	0	0	7
Хит-50+ Cu	0	0	5
Хит-150+ Cu	0	0	5
НСР ( $p < 0.05$ )	1.5	2.8	3.3

ния испытуемых образцов (0.05%) на прорастание конидий гриба *C. sativus*.

Установлено, что при использовании образцов хитозана в концентрации 0.05% разница в ингибировании прорастания конидий *C. sativus* определялась временем экспозиции, но не величиной ММ полимера (табл. 4). При этом из данных табл. 4 видно, что медный комплекс на основе хитозана Хит-5 полностью подавлял прорастание конидий гриба *C. sativus* в течение 2 сут и приводил к значительному снижению количества проросших спор аскомицета (до 10%) по сравнению с контролем (100%) на 3 сут инкубации.

В результате проведенных исследований получены оригинальные данные, которые позволили выявить общие закономерности в проявлении биологической активности хитозанов с разной молекулярной массой, но с одинаковой СД (85%), а также их медных комплексов на всех тест-объектах. Так, с увеличением ММ от 5 до 50 кДа анти-

микробная и антибактериальная активности увеличивались, а затем наблюдалась тенденция к их снижению. Включение в хитозан меди с образованием хелатного комплекса (Хит + Cu) способствовало повышению биологической активности независимо от величины ММ и типа микроорганизма. Это открывает возможность успешного использования комплексов хитозана с медью в сельскохозяйственной практике против широкого круга возбудителей болезней растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *El Hardrami A., Adam L. R., El Hadrami I., Daayf F // Marine Drugs.* 2010. V. 8. № 4. P. 968–987.
2. *Хитозан.* / Ред. К.Г. Скрябин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов. М.: Центр “Биоинженерия” РАН, 2013. 593 с.
3. *Kabanov V.L., Novinyuk L.V. // Food Syst.* 2020. № 3. P. 10–15.

4. Wang W., Xue C., Mao X. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 4532–4546.
5. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. // *Успехи биологической химии.* 2020. Т. 60. С. 317–368.
6. Ardean C., Davidescu C.M., Nemes N.S., Negrea A., Ciopres M., Duteanu N., Negrea P. Duda-Seiman D., Mustafa V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 14. P. 7449.
7. Jianhui Li., Shaoling Z. // *European Polymer Journal.* 2020. V. 138. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984>
8. Hosseinnejad M., Jafari S.M. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2016. V. 85. P. 467–475.
9. Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. // *Carbohydr. Polym.* 2017. V. 164. P. 268–283.
10. Matica M.A., Aachmann F.L., Tøndervik A., Sletta H., Ostafe V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019.V. 20. P. 5889. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
11. Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J. // *Int. J. Food Microbiology.* 2010. V. 144. P. 51–63.
12. Ильина А.В., Варламов В.П. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 3. С. 273–277.
13. Mellegård H., Strand S.P., Christensen B.E., Granum P.E., Hardy S.P. // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 148. P. 48–54.
14. Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pimtdo M.E., Xavier Malcata F. // *Ultramicroscopy.* 2009. V. 109. № 8. P. 854–860.
15. Kumar A.B.V., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. // *Biomacromolecules.* 2007. V. 2. № 2. P. 566–572.
16. Hafdani F., Sadeghinia N. // *World Acad. Sci., Engineering and Technology. International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences.* 2011. V. 5. № 2. P. 46–50.
17. Attjioui M., Gillet D., El Gueddari N.E., Moerschbacher B.M. // *MPMI.* 2021. V. 34. № 7. P. 770–778.
18. Matica A., Menghiu G., Ostafe V. // *New Front. Chem.* 2017. V. 26. № 1. P. 55–63.
19. Seyfarth F., Schliemann S., Elsner P., Hipler U.C. // *Int. J. Pharm.* 2008. V. 353. № 1–2. P. 139–148.
20. Li R., Guo Z., Jiang P. // *Carbohydrate Research.* 2010. № 345. P. 1896–1900.
21. Singburadom N., Piasai O., Dethaub T. // *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 2011. V. 45. P. 644–655.
22. Hongpattarakere T., Riyaphan O. // *J. Sci. Technol.* 2008. № 30. P. 1–9.
23. Cé R., Marchi J.G., Bergamo V.Z., Fuentesfria A.M., Lavayen V., Guterres S.S., Pohlmann A.R. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2016. № 511. P. 153–161.
24. de Oliveira Pedro R., Takaki M., Gorayeb T.C.C., Bianchi V.L.D., Thomeo J.C., Tiera M.J., de Oliveira Tiera V.A. // *Microbiol. Res.* 2013. V. 168. № 1. P. 50–55.
25. Swati Choudhary M.K., Joshi A., Saharan V. // *Int. J. Current Microbiol. Appl. Sci.* 2017. V. 6. № 11. P. 1335–1350.
26. Al-Dhabaan F.A., Shoala. Ali A.A.M., Alaa M., Abd-El-salam K. // *Int. J. Agric. Technol.* 2017 V. 13. № 5. P. 753–769.
27. Gritsch L., Lovell C., Goldmann W., Boccaccini A. // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 179. P. 370–378.
28. Власов П.С., Киселев А.А., Домнина Н.С., Попова Э.В., Тютерев С.Л. // *Журн. прикладной химии.* 2009. Т. 82. № 9. С. 1571–1575.
29. Muzzarelli Riccardo, A.A. *Chitin.* Oxford: Pergamon Press, 1977. 309 p.
30. Kong X. // *Carbohydr. Polym.* 2012. № 88. P. 336–341.
31. Кулешова С.И. // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения* 2015. № 3. С. 13–17.
32. *Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность.* / Ред. Е.И. Андреева, В.С. Картомышев. НИИТЭХИМ, 1990. С. 4–5.
33. Palma-Guerrero J., Jansson H.-B., Salinas J., Lopez-Llorea L.V. // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 104. № 2. P. 541–53.
34. Divya K., Vijayan S., George T.K., Jisha M.S. // *Fibers Polim.* 2017. V. 18. № 2. P. 221–230.
35. Курек Д.В. В Хитозан. / Ред. К.Г. Скрябин, С.Н. Михайлов, В.П. Варламов. М.: Центр “Биоинженерия” РАН, 2013. С. 61–70.
36. Abdeltwab W.M., Abdelalim Y.F., Metry W.A., Eldeggedy M. // *J. Adv. Lab. Res. Biol.* 2019. V. 10. № 1. P. 8–15.

## Fungicidal and Bactericidal Activity of Chitosans with Different Molecular Weights and Copper Complexes Based on Them

E. V. Popova<sup>a,\*</sup>, N. M. Kovalenko<sup>a</sup>, and N. S. Domnina<sup>b</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Institute for Plant Protection, St.-Petersburg-Pushkin, 196608 Russia

<sup>b</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

\*e-mail: elzavpopova@mail.ru

This work is devoted to the study of the antibacterial and antifungal activity of chitosans with deacetylation degree 85% and molecular weight (MW) in a wide range of values (5, 10, 50, 150 kDa) and copper complexes obtained on their basis. It was found that the studied activity of chitosan has a certain dependence on MW of chitosan and its concentration. It has been shown that within the concentration range of 0.02–01%, the bio-cidal activity of copper complexes does not depend on MW of chitosan, but at the same time they are characterized by a higher antibacterial and antifungal activity compared to chitosan.

**Keywords:** chitosan, copper complexes of chitosan, bactericidal activity, antifungal activity

УДК 632.938.2

## ПРИМЕНЕНИЕ ХИТОЗАНА В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ОТ БОЛЕЗНЕЙ И ПОВЫШЕНИИ УРОЖАЙНОСТИ

© 2022 г. Л. Е. Колесников<sup>1</sup>\*, Э. В. Попова<sup>2</sup>, И. И. Новикова<sup>2</sup>,  
Ю. Р. Колесникова<sup>3</sup>, Е. Д. Балагурова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный аграрный университет", Санкт-Петербург, 196601 Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608 Россия

<sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, 190000 Россия

\*e-mail: kleon9@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.08.2021 г.

После доработки 24.10.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Исучена эффективность защитного действия двух комплексов хитозана с биологически активными веществами. Комплекс Хитозан I – включал 0.1%-ный раствор (по хитозану, хитозана 100 и 50 кДа (1 : 1), янтарную кислоту, глутаминовую кислоту, 0.025%-ную салициловую кислоту. Хитозан II включал 0.1%-ный раствор (по хитозану), хитозана 50 кДа, янтарную кислоту, глутаминовую кислоту; 0.0015%-ную индолилуксусную кислоту и 0.1%-ный салицилат хитозана 60 кДа, который имел в своем составе 25% ионно-связанных фрагментов салициловой кислоты. Комплексы Хитозан I и Хитозан II существенно снижали поражение пшеницы бурой ржавчиной и септориозно-пиренофорозной пятнистостью, а в варианте Хитозан I отмечено снижение развития мучнистой росы. Салицилат хитозана (0.1%) уменьшал степень поражения пшеницы корневой гнилью на 79%, желтой ржавчиной на 29.1%, подавлял развитие мучнистой росы, увеличивал урожайность на 32.8% и статистически достоверно повышал значения 55.6% показателей, характеризующих рост и развитие пшеницы, продуктивность и урожайность. Комплексы “Хитозан I” и “Хитозан II” оказали существенное влияние на 11.1% и 27.8% показателей продуктивности пшеницы соответственно.

**Ключевые слова:** мягкая пшеница, хитозановые составы, 0.1% салицилат хитозана, продуктивность, структура урожайности, корневая гниль, болезни листьев пшеницы

**DOI:** 10.31857/S0555109922030072

В настоящее время большое внимание при возделывании сельскохозяйственных культур уделяется ресурсосберегающим технологиям, основанным на использовании биопрепаратов, содержащих биологически активные вещества, в том числе различные органические соединения. Биопрепараты на основе хитозана могут стать альтернативой химическим препаратам, поскольку известно, что хитозан стимулирует рост и развитие растений, а также повышает фитоиммунитет [1]. Химические пестициды и удобрения, особенно при неправильном применении, могут наносить существенный урон агроэкосистемам и представлять реальную опасность для окружающей среды. Биопрепараты на основе хитозана можно использовать для замачивания семян, опрыскивания растений или внесения в почву. Однако в связи с тем, что хитозан не растворяется ни в органических растворителях, ни в воде, то в качестве основы препаратов целесообразно использовать его производные и их олигомеры [2].

Хитозан и его производные обладают выраженным антимикробным, противовирусным, фунгицидным действием [3]. Однако эффективность его олигомеров зависит от молекулярной массы хитозана [4]. В частности, сильным бактерицидным действием обладает N-карбоксивбутилхитозан [5], композиты хитозана, содержащие никель и медь [6].

Хитозан в концентрации 1.0 мг/мл ингибировал рост большинства микромицетов *in vitro*, однако некоторые микромицеты, в основном из класса зигомицет, проявляли устойчивость к фунгицидному действию хитозана, что обусловлено наличием в составе их клеточных стенок природного хитозана [7].

В работе [8] описаны 24 производных хитозана (N-алкил, N-бензилхитозаны, N-додецилхитозан, N-(2,6-дихлорбензил, N-(*p*-изопропилбензил и др.), обладающие фунгицидными свойствами, в частности, в отношении *Pyricularia grisea* и

*Botrytis cinerea*. Производное хитозана, полученное добавлением к хитозану N-метилефосфоно-вой кислоты, ингибировало развитие *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* (*F. eumartii*), а также было эффективно против *Botrytis cinerea* и *Phytophthora infestans*. Кроме того, такая модификация хитозана обладала высокой избирательностью токсического действия на микромицетов, что особенно важно при разработке биопрепаратов на ее основе [9].

При воздействии на растения хитозан может стимулировать реакции сверхчувствительности и синтез фитоалексинов, защитных белков и ингибиторов протеиназ [10, 11].

При обработке пшеницы наночастицами салицилата хитозана на различных стадиях роста и развития растений выявлено повышение активности фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и *b*) и ряда показателей, характеризующих структуру урожайности, в том числе, длину колоса, количество колосков в колосе, массу зерна колоса [12].

Хитозан и салициловая кислота (0.5 и 1.0 мМ) повышали устойчивость пшеницы к засухе, о чем свидетельствуют морфологические, физиологические и фитохимические характеристики растений. Роль хитозана и СК в снижении негативных последствий водного стресса и повышении засухоустойчивости растений обусловлена их участием в регуляции осмотического баланса растений путем накопления пролина и растворимых сахаров, снижения уровня малонового диальдегида и активацией антиоксидантной системы [13]. Положительное действие хитозана на пшеницу, возделываемую в условиях недостаточного увлажнения, подтверждается в работе [14].

Таким образом, профилактическая обработка растений хитозаном и его производными может способствовать повышению их адаптивного потенциала к условиям выращивания, способствует выработке антиоксидантных ферментов, вторичных метаболитов и абсцизовой кислоты [15].

В ВИЗР С. Л. Тютеревым [16] разработана концепция создания препаратов-индукторов на основе хитозана для применения в защите растений. Увеличение биологической эффективности препаратов достигается путем создания механической смеси хитозана с биологически активными веществами (БАВ) — сигнальными молекулами, физиологически активными органическими кислотами, в том числе — салициловой кислотой (СК), которая в качестве основного индуктора устойчивости занимает ключевую позицию в защите растений от вредных организмов [17].

Цель настоящей работы — анализ эффективности двух комплексов хитозана с добавлением различных биологически активных веществ и 0.1%-ного салицилата хитозана при выращивании мягкой пшеницы.

## МЕТОДИКА

Для проведения исследований был использован сорт мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Ленинградская 6, к-64900, предоставленный отделом генетических ресурсов пшеницы ВИРа.

Образцы пшеницы были высеяны на учетных делянках площадью 1.0 м<sup>2</sup> рядовым способом посева с междурядьями 15 см и расстоянием в ряду 1–2 см (400 зерен/м<sup>2</sup>). Глубина заделки семян: 5–6 см. Полевой опыт по определению влияния хитозановых комплексов и 0.1%-ного салицилата хитозана на продуктивность пшеницы и интенсивность развития возбудителей болезней был заложен в трехкратной повторности.

— Схема опыта предусматривала четыре варианта: без обработки (контроль — вода);

— комплекс Хитозан I — 0.1%-ный раствор по хитозану: хитозан 100 кДа : хитозан 50 кДа (1 : 1), янтарная кислота, глутаминовая кислота, 0.025% салициловая кислота. Для приготовления 100 мл 0.1% раствора хитозана к 100 мг смеси хитозанов — хитозана 100 кДа : хитозана 50 кДа (1 : 1) добавляли 50 мг янтарной и 50 мг глутаминовой кислоты, в дальнейшем, смесь растворяли в 100 мл воды;

— комплекс Хитозан II — 0.1% раствор по хитозану: Хитозан 50 кДа; янтарная кислота, глутаминовая кислота; 0.0015% индолилуксусной кислоты);

— 0.1%-ный салицилат хитозана 60 кДа, содержащий 25% ионно-связанных фрагментов салициловой кислоты.

Схема полевого опыта включала обработку семян пшеницы Ленинградка 6, к-64900 препаратами перед посевом и четырехкратное опрыскивание вегетирующих растений в фазы кушения, выхода в трубку, колошения и цветения. Норма расхода рабочей жидкости при обработке семян полусухим способом — 1 мл/100 г, при опрыскивании растений — 100 мл/м<sup>2</sup>.

Продуктивность пшеницы характеризовали с помощью определения 18 показателей: длины колоса, числа колосков в колосе, числа зерен в колосе, массы зерен одного колоса, массы 1000 зерен, массы колоса, высоты растения, фазы растения по шкале Эукарпия (Цадокса), числа и длины корней (главный зародышевой корень, зародышевые и колеоптильные корни), количества и длины узловых корней, массы корней, продуктивной и общей кустистости, площади флагового и предфлагового листа пшеницы, массы вегетативной части растений (без корней и колоса). В каждом варианте опыта оценивали 20 растений [18].

Потенциальную урожайность пшеницы  $Y_p$  (т/га) рассчитывали по продуктивной кустистости и числу растений, высеянных на 1 м<sup>2</sup>:  $Y_p = 10 \times M_k K_p P_p$ , где  $M_k$  — масса зерен колоса одного



Рис. 1. Конидии *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. – возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили (увеличение 600×).

растения, г;  $K_n$  – продуктивная кустистость образца;  $P_n$  – плотность посева (количество растений на 1 м<sup>2</sup>).

Оценку степени поражения растений гельминтоспориозной корневой гнилью *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (рис. 1), по вариантам опыта проводили в лабораторных условиях в фазы кушения пшеницы и колошения-цветения в соответствии с общепринятой методикой [19].

При оценке интенсивности поражения пшеницы возбудителями болезней анализировали комплекс показателей патогенеза с использованием общепринятых шкал учета и расчетных дополнительных характеристик: мучнистая роса *Blumeria graminis* (DC.) Speer. (степень развития, число и площадь пятен с налетом); бурая ржавчина пшеницы (рис. 2); *Puccinia triticina* Erikss. (степень развития, число пустул, площадь пустулы); желтая ржавчина пшеницы *Puccinia striiformis* West. (степень развития, число и длина полос с пустулами, число пу-

стул в полосе, суммарное число пустул на лист, площадь пустулы); септориозно-пиренофорозная пятнистость *Stagonospora nodorum* (Berk.) Berk., *Septoria tritici* Roberge et Desm., *Pyrenophora tritici repentis* (Died.) Drechsler (степень развития). Оценивали интенсивность поражения флаговых и предфлаговых листьев пшеницы [20].

Размер пустул для видов ржавчины и пятен с налетом для возбудителя мучнистой росы устанавливали с помощью окулярного и объективного микрометров, предполагая их эллиптическую форму, с использованием формулы:  $S_n = m \cdot \pi \cdot a \cdot b$ , где  $a$  и  $b$  – значения полуосей эллипса (в линиях окулярного микрометра),  $m$  – масштабный коэффициент микроскопа,  $S_n$  – площадь пустулы или пятна с налетом (мм<sup>2</sup>).

Алгоритм компьютерной обработки данных опыта включал создание первичной электронной базы данных измерений в электронной таблице Microsoft Excel, кодирование показателей измерений и формирование кодировочной таблицы результатов опыта в системе IBM SPSS. Кроме того, для наглядного представления результатов опыта использованы графические возможности пакета Statistica.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием методов параметрической статистики. Рассчитывали средние значения показателей, стандартную ошибку для средних, 95%-доверительные интервалы. Достоверные различия между средними измерениями показателей в вариантах опыта определяли по критерию Стьюдента, предполагая равенство дисперсий (распределения) сравниваемых групп при  $P < 0.05$ . Процент изменений в значениях показателей продуктивности в зависимости от применения хитозановых комплексов и 0.1%-ного салицилата хитозана был рассчитан путем сопоставления данных измерений в вариантах опыта с контролем и

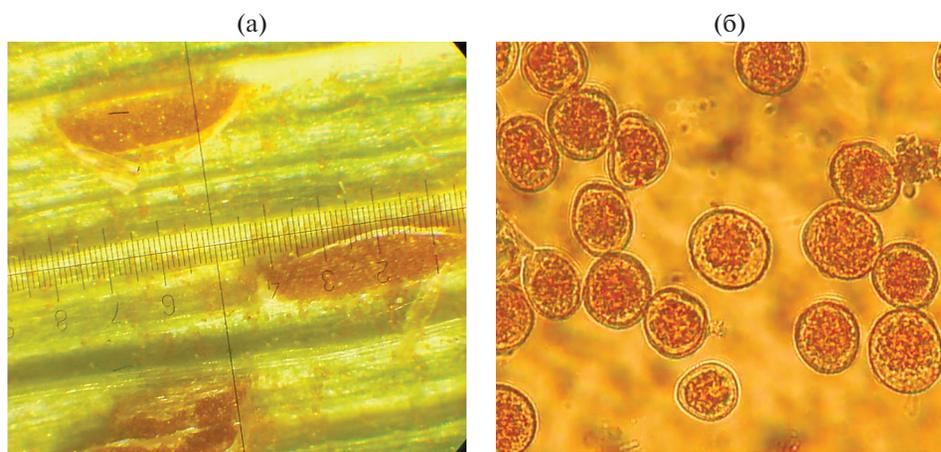


Рис. 2. Уредопустулы бурой ржавчины пшеницы увеличение 56× (а) и 600× (б).

определения положительной и отрицательной относительной тенденции изменений, а также выявления существенности различий по критерию Стьюдента при  $P < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

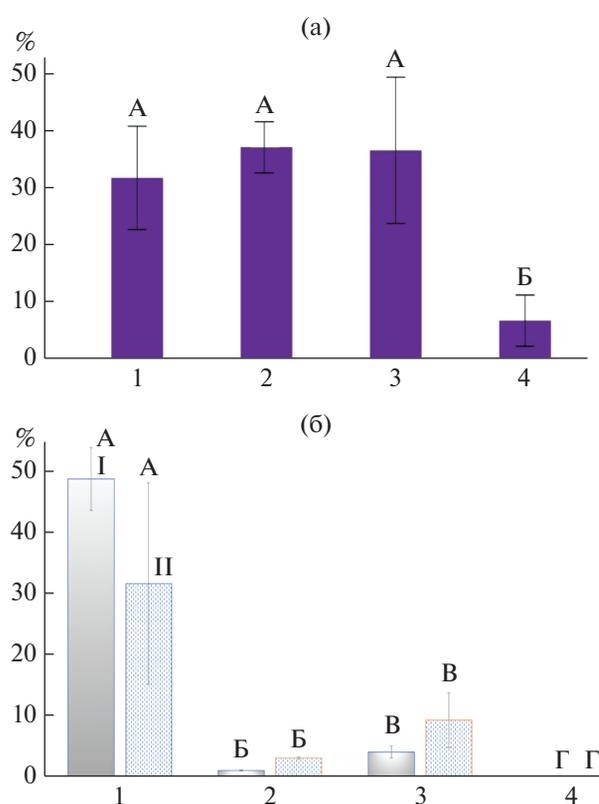
Наибольшее снижение интенсивности развития корневой гнили пшеницы – на 79.0%, было зафиксировано в варианте опыта с использованием 0.1% салицилата хитозана (рис. 3). Кроме того, в указанном варианте опыта не отмечено симптомов развития мучнистой росы в период вегетации растений, в то время как в контроле (без обработки) интенсивность поражения пшеницы достигала  $52.5 \pm 2.5\%$ .

При обработке растений комплексом Хитозан II развитие мучнистой росы достоверно снизилось на 5% ( $t = 4.9$ ). Однако при более точном подсчете на предфлаговом листе пшеницы числа пятен с налетом и определении площади пятен с налетом выявлено снижение значений показателей на 82.5% ( $t = 3.9$ ) и 81.1% ( $t = 3.5$ ) соответственно. Комплекс Хитозан I не оказывал существенного влияния на интенсивность развития мучнистой росы.

После применения полифункционального комплекса Хитозан I отмечали существенное снижение ( $P < 0.05$ ) интенсивности развития бурой ржавчины пшеницы – на 17.4% по сравнению с контролем, а в варианте опыта Хитозан II – на 13.8%. Число пустул возбудителя, рассчитанное на всю площадь листа пшеницы, в указанных вариантах опыта снизилось на 92%, с 156.9 – в контроле до 12.2 шт./лист в опыте и на 65.6%, с 156.9 – в контроле до 54.0 шт./лист. Существенное снижение значений при  $P < 0.05$  площади пустулы возбудителя бурой ржавчины – на 56.4% (с  $0.097 \text{ мм}^2$  – в контроле до  $0.042 \text{ мм}^2$ ) было выявлено при использовании комплекса Хитозан II. В варианте опыта Хитозан I площадь пустулы снизилась на 32.0%.

Степень поражения пшеницы возбудителем желтой ржавчины снизилась существенно – на 29.1% ( $t = 3.1$ ), при применении 0.1% салицилата хитозана. В указанном варианте опыта число пустул в полосе уменьшилось на 47.1% (с 179.5 до 94.9 шт.), а число и длина полос с пустулами микромицета на флаговых листьях снизились на 40.8% (с 12.5 до 7.4 шт.) и 29.8% (с 74.7 до 52.4 мм) соответственно. На значения площади пустулы микромицета 0.1%-ный салицилат хитозана не оказывал существенного влияния. Однако при обработке растений комплексом Хитозан II выявлено снижение показателя на 35.8% (с  $0.04676 \text{ мм}^2$  – в контроле до  $0.03000 \text{ мм}^2$ ).

В варианте опыта с использованием 0.1%-ного салицилата хитозана не было выявлено развитие септориозно-пиренофорозной пятнистости

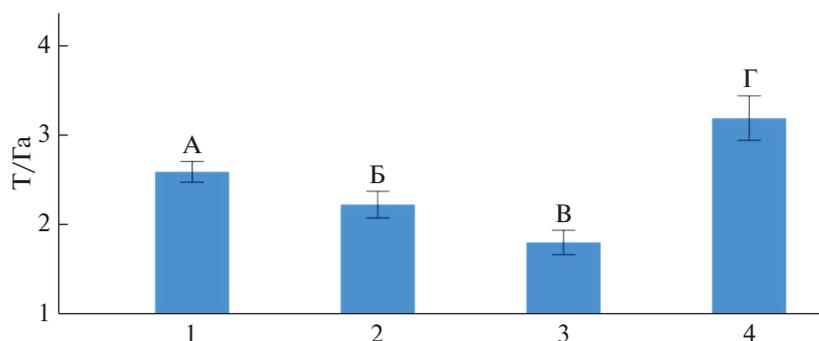


**Рис. 3.** Развитие корневой гнили (%) мягкой пшеницы (а) и септориозно-пиренофорозной пятнистости (б, %) при использовании комплексов Хитозан I (2), Хитозан II (3) и 0.1%-ного салицилата хитозана (4) по сравнению с контролем (1): I – флаговый лист; II – предфлаговый. Одинаковыми буквами обозначены варианты опыта без достоверных различий согласно 95%-ному доверительному интервалу для средних измерений показателя.

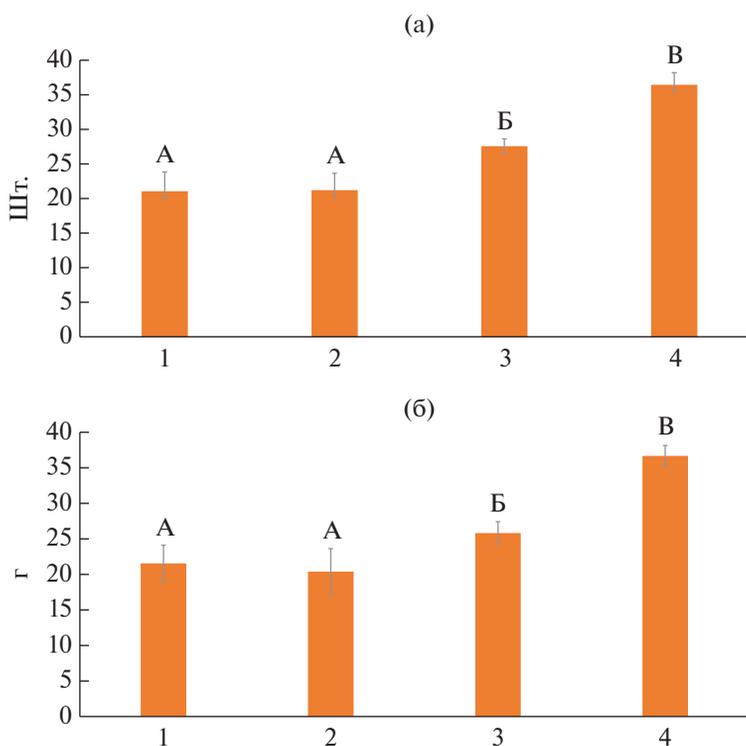
(рис. 3). Обработка растений комплексом Хитозан I приводила к сильному снижению развития болезни на флаговых (предфлаговых) листьях с 48.6% в контроле до 1% (с 31.5% в контроле до 3% в опыте). При применении комплекса Хитозан II зарегистрировано снижение септориозно-пиренофорозной пятнистости на флаговых и предфлаговых листьях до 4 и 9% соответственно.

Максимальное изменение потенциальной урожайности пшеницы на 32.8% по сравнению с контролем (с 2.4 до 3.2 т/га) было отмечено в варианте опыта с использованием 0.1% салицилата хитозана (рис. 4).

Возможно, это было обусловлено увеличением важнейших элементов структуры урожайности пшеницы: числа зерен в колосе – на 73.1% (рис. 5а), массы 1000 зерен – на 70.1% (рис. 5б), продуктивной кустистости растений – на 134.7% (рис. 6), длины колоса – на 6.1%, числа колосков в колосе – на 8.2% (табл. 1).



**Рис. 4.** Изменение урожайности мягкой пшеницы при использовании комплексов на основе хитозана Хитозан I (2), Хитозан II (3) и 0.1% салицилата хитозана (4) по сравнению с контролем (1). Одинаковыми буквами обозначены варианты опыта без достоверных различий согласно 95%-ному доверительному интервалу для средних измерений показателя.



**Рис. 5.** Число зерен в колосе мягкой пшеницы (а) и масса 1000 зерен (б) при использовании комплексов на основе хитозана Хитозан I (2), Хитозан II (3) и 0.1% салицилата хитозана (4) по сравнению с контролем (1). Описание буквенных обозначений как на рис. 4.

Кроме того, зарегистрировано существенное увеличение общей кустистости растений – на 91.0% (рис. 7), площади предфлагового листа – на 9.7%, высоты растений – на 17.7%, массы вегетативной части – на 16.7% (табл. 1).

При использовании 0.1%-ного салицилата хитозана выявлено существенное увеличение массы корней – на 27.3% (с 1.1 до 1.4 г), числа корней – на 28.6% (с 6.3 в контроле до 8.1 шт.), но сниже-

ние их длины на 26.6% (с 61.6 мм в контроле до 45.2 мм, табл. 1).

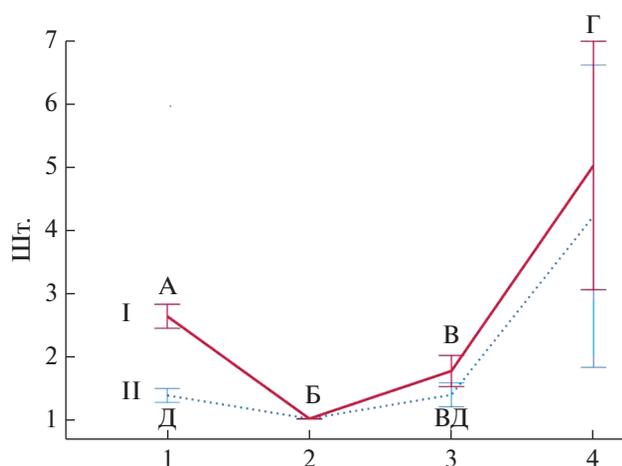
В варианте опыта Хитозан I, по сравнению с контролем, выявлено сокращение периода созревания пшеницы (по фазе онтогенеза) на 21.3% и увеличение высоты растений на 25.5%, но масса корней растений снизилась на 81.8%.

По сравнению с другими вариантами опыта наибольшее влияние на рост вегетативной массы

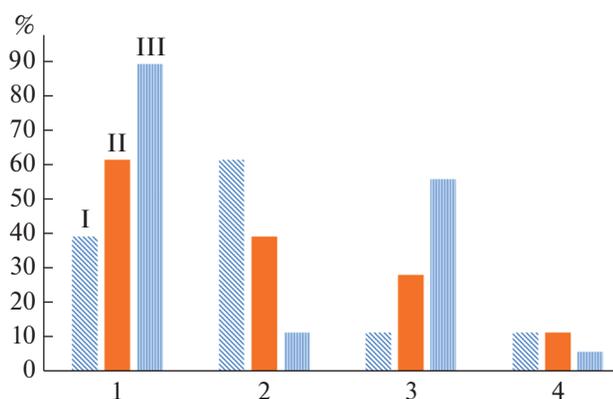
Таблица 1. Морфометрические показатели продуктивности мягкой пшеницы при применении хитозановых комплексов и 0.1% салицилата хитозана

Варианты опыта	Фаза растения, балл (изменения. к контролю, %)	Число корней, шт. (изменения. к контролю, %)	Длина корней, мм (изменения. к контролю, %)	Число узловых корней, шт. (изменения. к контролю, %)	Длина узловых корней, мм (изменения. к контролю, %)	Масса корней, г (изменения. к контролю, %)	Высота растения, см (изменения. к контролю, %)
Контроль (вода)	55.0 ± 2.3 (-)	6.3 ± 0.5 (-)	61.6 ± 3.4 (-)	8.9 ± 0.7 (-)	61.1 ± 4.3 (-)	1.1 ± 0.1 (-)	68.5 ± 4.1 (-)
Хитозан I	66.7 ± 1.5 <b>(21.3)*</b>	5.6 ± 0.6 (-11.1)	61.6 ± 4.8 (0.0)	7.2 ± 0.6 (-19.1)	52.3 ± 4.2 (-14.4)	0.2 ± 0.0 (-81.8)*	86.0 ± 4.3 <b>(25.5)*</b>
Хитозан II	60.8 ± 1.6 <b>(10.5)*</b>	5.5 ± 0.5 (-12.7)	68.9 ± 3.2 (11.9)	8.1 ± 0.6 (-9.0)	63.4 ± 2.7 (3.8)	0.4 ± 0.1 (-63.6)*	81.0 ± 2.3 <b>(18.2)*</b>
0,1% салицилат хитозана	57.4 ± 0.4 (4.4)	8.1 ± 0.5 <b>(28.6)*</b>	45.2 ± 3.0 <b>(-26.6)*</b>	9.7 ± 1.4 (9.0)	60.5 ± 2.5 (-1.0)	1.4 ± 0.1 <b>(27.3)*</b>	80.6 ± 1.8 <b>(17.7)*</b>
Варианты опыта	Площадь флагового листа, см <sup>2</sup> (изменения. к контролю, %)	Площадь предфлагового листа, см <sup>2</sup> (изменения. к контролю, %)	Масса вегетативной части, г (изменения. к контролю, %)	Длина колоса, мм (изменения. к контролю, %)	Число колосков в колосе, шт. (изменения. к контролю, %)	Масса колоса, г (изменения. к контролю, %)	Масса зерен одного колоса, г (изменения. к контролю, %)
Контроль (вода)	5.7 ± 0.2 (-)	6.2 ± 0.3 (-)	1.8 ± 0.1 (-)	67.3 ± 1.6 (-)	13.4 ± 0.6 (-)	0.6 ± 0.1 (-)	0.7 ± 0.0 (-)
Хитозан I	5.3 ± 0.6 (-7.0)	5.3 ± 0.4 (-14.5)	1.8 ± 0.2 (0.0)	68.1 ± 3.4 (1.2)	14.1 ± 0.7 (5.2)	0.4 ± 0.1 (-33.3)	0.6 ± 0.0 (-14.3)
Хитозан II	5.9 ± 0.4 (3.5)	5.9 ± 0.3 (-4.8)	2.7 ± 0.2 <b>(50.0)*</b>	66.5 ± 2.1 (-1.2)	13.0 ± 0.5 (-3.0)	0.7 ± 0.0 (16.7)	0.8 ± 0.0 (14.3)
0,1% салицилат хитозана	6.0 ± 0.1 (5.3)	6.8 ± 0.2 <b>(9.7)*</b>	2.1 ± 0.1 <b>(16.7)*</b>	71.4 ± 1.8 <b>(6.1)*</b>	14.5 ± 0.4 <b>(8.2)*</b>	0.7 ± 0.0 (16.7)	0.8 ± 0.0 (14.3)

\* Различия достоверны при уровне значимости P < 0.05.



**Рис. 6.** Продуктивная (II) и общая кустистость (I) мягкой пшеницы при использовании комплексов на основе хитозана Хитозан I (2), Хитозан II (3) и 0.1% салицилата хитозана (4) по сравнению с контролем (1).



**Рис. 7.** Особенности влияния комплексов Хитозан I (I), Хитозан II (II) и 0.1% салицилата хитозана (III) на изменение величины показателей продуктивности пшеницы по сравнению с контролем. 1 – доля положительных изменений показателей; 2 – доля отрицательных изменений показателей; 3 – доля статистически достоверных положительных изменений показателей ( $P < 0.05$ ); 4 – доля статистически достоверных отрицательных изменений показателей ( $P < 0.05$ ).

растений (на 50.0%) отмечено при применении комплекса Хитозан II. Кроме того, в указанном варианте опыта выявлено сокращение периода созревания пшеницы (по фазе онтогенеза) – на 10.5%, существенный рост высоты растений – на 18.2%. Однако масса корней была меньше относительно контроля – на 63.6%.

Сравнительная эффективность хитозановых комплексов и 0.1%-ного салицилата хитозана в отношении 18 показателей продуктивности пшеницы приведена на рис. 7.

Максимальное относительное число положительных изменений показателей и статистически достоверное число положительных изменений показателей продуктивности, по сравнению с контролем, выявлено при использовании 0.1%-ного салицилата хитозана 88.9 и 55.6% соответственно. В варианте опыта Хитозан I – 38.9 и 11.1%, а в варианте Хитозан II – 61.1 и 27.8%, соответственно.

Таким образом, наилучшие результаты были получены при использовании 0.1%-ного салицилата хитозана как в отношении снижения развития корневой гнили, мучнистой росы, желтой ржавчины, септориозно-пиренофорозной пятнистости, так и продуктивности пшеницы. При использовании 0.1%-ного салицилата хитозана отмечено увеличение урожайности пшеницы на 32.8% по сравнению с контролем, а также статистически достоверный рост значений 55.6% показателей, характеризующих рост и развитие пшеницы, продуктивность и урожайность: длины колоса, числа колосков в колосе, числа зерен в колосе, высоты растений, массы корней, числа корней, продуктивной и общей кустистости, площади предфлагового листа, массы вегетативной части. Комплексы Хитозан I и Хитозан II способствовали существенному снижению поражения пшеницы возбудителями бурой ржавчины и септориозно-пиренофорозной пятнистости, а в варианте Хитозан I отмечено уменьшение развития мучнистой росы. Комплекс Хитозан I оказал положительное влияние только на 11.1% показателей продуктивности: фаза развития и высота растений, а комплекс Хитозан II – на 27.8% показателей, характеризующих фазу онтогенеза, высоту растений, массу вегетативной части растений.

Таким образом, результаты работы могут найти практическое применение при разработке экологически оптимальных технологий возделывания пшеницы и улучшения фитосанитарного состояния посевов.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0006 “Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dwivany F., Meitha K., Kuswati, Esyanti R., Nugrahap-  
raja H. // Res. J. Biotechnol. 2021. V. 16. № 2. P. 87–92.
2. Kim S. In Book: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides  
and Their Derivatives. Biological Activities and Applica-  
tions. /Ed. Se-Kwon Kim. CRC Press, 2010. P. 605–617.
3. El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F. //  
Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. 968–987.  
<https://doi.org/10.3390/md8040968>

4. Kulikov S.N., Chirkov S.N., Il'ina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. № 2. P. 200–203.  
<https://doi.org/10.1134/s0003683806020165>
5. Muzzarelli R., Tarsi R., Filippini O., Giovanetti E., Biagini G., Varaldo P.E. // Antimicrob. Agents Chemother. 1990. V. 34. № 10. P. 2019–2023.
6. Olanipekun E., Ayodele O., Olatunde O., Olusegun S.J. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 183.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.162>
7. Allan C.R., Hadwiger L.A. // Exp. Mycol. 1979. № 3. P. 285–287.
8. Rabea E.I., El Badawy M., Rogge T.M., Stevens C.V., Hofte M., Steurbaut W., Smagghe G. // Pest Manag. Sci. 2005. V. 61. P. 951–960.  
<https://doi.org/10.1002/ps.1085>
9. Mesas F., Terrile M., Silveyra M., Zúñiga A., Rodríguez M.S., Casalongué C., Mendieta J. // Plant Pathol. J. 2021. V. 37. № 6. P. 533–542.  
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2021.0090>
10. Pospieszny H., Chirkov S., Atabekov J. // Plant Science. 1991. V. 79. P. 63–68.
11. Faoro F., Sant S., Iriti M., Maffi D., Appiano A. In: “Chitin Enzymology” / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Italy: Atec, 2001. P. 57–62.
12. Kadam P.M., Prajapati D., Kumaraswamy R.V., Kumari S., Khaidem A., Pal A., Harish, Sharma S.K., Saharan V. // Plant Physiol. Biochem. 2021. V. 162. P. 699–705.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.021>
13. Seraj, R.G.M., Behnamian, M., Ahmadikhah, A. Shariati V., Dezhsetan S. // Acta Physiologiae Plantarum. 2021. V. 43. № 7. P. 101.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-021-03264-8>
14. Morovvat S., Sadrabadi R., Nofereest K., Darban A., Salati M. // Agrivita J. Agric. Sci. 2021. V. 43.  
<https://doi.org/10.17503/agrivita.v43i1.2796>
15. Pongprayoon W., Siringam T., Panya A., Roytrakul S. // Applied Science and Engineering Progress. 2020. V. 15. № 1.  
<https://doi.org/10.14416/j.asep.2020.12.007>
16. Тютеев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. Санкт-Петербург: ВИЗР, 2014. 212 с.
17. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
18. Колесников Л.Е., Попова Э.В., Новикова И.И., Прияткин Н.С., Архипов М.В., Колесникова Ю.Р. и др. // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 1024–1040.
19. Попов Ю.В. // Plant Protection and Quarantine. 2011. № 8. С. 45–47.
20. Колесников Л.Е., Новикова И.И., Сурин В.Г., Попова Э.В., Прияткин Н.С., Колесникова Ю.Р. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 1–8.

## The Chitosan Application in Wheat Protection from Diseases and Yield Increasing

L. E. Kolesnikov<sup>a,\*</sup>, E. V. Popova<sup>b</sup>, I. I. Novikova<sup>b</sup>, Yu. R. Kolesnikova<sup>c</sup>, and E. D. Balagurova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Saint-Petersburg State Agrarian University, Faculty of Agrotechnologies, Soil science and Ecology, Department of Plant Protection and Quarantine, St-Petersburg – Pushkin, 196601 Russia

<sup>b</sup> All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), Laboratory of microbiological plant protection, Saint Petersburg-Pushkin, 196608 Russia

<sup>c</sup> Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Genetic Resource of Wheat Department, Plant Introduction Department, St–Petersburg, 190000 Russia

\*e-mail: kleon9@yandex.ru

The protective effect of two chitosan complexes with biologically active substances: Chitosan I – 0.1% chitosan solution: Chitosan mM 100 kDa, Chitosan mM 50kDa (1 : 1), succinic acid, glutamic acid; 0.025% salicylic acid; Chitosan II – 0.1% chitosan solution: Chitosan mM 50kDa; succinic acid, glutamic acid; 0.0015% indolylacetic acid and 0.1% chitosan salicylate mM 60 kDa, containing 25% ion-bound fragments of salicylic acid was studied on wheat by the period 2016–2020. The complexes Chitosan I and Chitosan II significantly reduced the wheat affection by brown rust and septoria-pyrenophorous spotting, and in the Chitosan I variant, decrease in the powdery mildew development was noted. Chitosan salicylate (0.1%) reduced the degree of root rot damage to wheat by 79%, yellow rust by 29.1%, suppressed the powdery mildew development; increased yield by 32.8% and caused the growth of 55.6% indicators of wheat growth, development, productivity and yield. The complexes Chitosan I and Chitosan II had a positive impact on 11.1% and 27.8% of wheat productivity indicators.

**Keywords:** soft wheat, chitosan compositions, 0.1% chitosan salicylate, productivity, yield structure, root rot, wheat leaf diseases

УДК 632.9:57.021

## ПУТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ САЛИЦИЛАТА ХИТОЗАНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОПРЕПАРАТА ВИТАПЛАН В ОТНОШЕНИИ *Cochliobolus sativus*

© 2022 г. И. И. Новикова<sup>1</sup> \*, Э. В. Попова<sup>1</sup>, И. Л. Краснобаева<sup>1</sup>, Н. М. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений” (ВИЗР),

Пушкин, Санкт-Петербург, 196608 Россия

\*e-mail: irina\_novikova@inbox.ru

Поступила в редакцию 25.08.2021 г.

После доработки 22.10.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Изучена возможность повышения биологической эффективности биопрепарата Витаплан путем включения в состав салицилата хитозана как индуктора болезнестойчивости растений против темно-бурой пятнистости пшеницы. Установлено, что добавление салицилата хитозана в концентрации 0.1% в среду для глубинного культивирования штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D (компонентов препарата Витаплан), а также к препарату Витаплан увеличивало его защитный эффект в патосистеме пшеница – *Cochliobolus sativus* в 1.5–2 раза. Повышенная биологическая активность новых форм препарата Витаплан, по-видимому, является результатом сочетания фунгицидной активности биопрепарата и индукции защитных реакций растения салицилатом хитозана.

**Ключевые слова:** биопрепарат Витаплан, фунгистатическая активность, антагонистический эффект, салицилат хитозана, индуцированная устойчивость, пшеница, темно-бурая пятнистость

**DOI:** 10.31857/S0555109922030102

Одна из актуальных задач сельского хозяйства – разработка эффективных средств и способов снижения потерь урожая от болезней сельскохозяйственных культур. При этом требования к безопасности применяемых средств защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов – возбудителей болезней постоянно увеличиваются. В настоящее время особое внимание уделяется наиболее перспективному и экологически безопасному направлению в защите растений, связанному с использованием препаратов элиситорного действия, повышающих неспецифическую устойчивость растений к фитопатогенам. К числу таких препаратов относится хитозан и препараты на его основе, которые широко используют в защите растений от болезней в качестве индукторов болезнестойчивости [1–3].

Не меньшее внимание в последние годы уделяется разработке полифункциональных биопрепаратов на основе эндофитных штаммов бактерий или микромицетов, снижающих численность популяций фитопатогенных видов. Механизмы действия таких препаратов связаны не только с синтезом различных метаболитов, обладающих прямой антагонистической активностью, но и с запуском системной индуцированной устойчивости вслед-

ствие образования штаммами-продуцентами гормонов, таких, как салициловая кислота (СК), абсцизовая, жасмоновая кислоты, этилен, а также циклических липопептидов [4–8].

В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом наиболее широко применяют биопрепараты на основе штаммов *Bacillus subtilis* Cohn. [9–11]. Целый ряд препаративных форм на основе отобранных высокоактивных штаммов этого вида разработаны в ВИЗР: Алирин-Б, Гамаир, Витаплан. Полифункциональные биопрепараты на основе штаммов микробов-антагонистов практически не уступают по эффективности химическим фунгицидам, обладая по сравнению с ними целым рядом преимуществ: отсутствием формирования резистентности у фитопатогенных видов, безопасностью для полезной энтомофауны, низкой токсичностью в отношении теплокровных и человека, и способностью длительно контролировать численность фитопатогенов после интродукции в агробиотенос. Для повышения биологической эффективности биопрепаратов заслуживает внимания подход, позволяющий увеличивать способность штаммов-продуцентов запускать каскад защитных реакций и повышать системную устойчивость растений.

В этой связи для усиления биологической активности биопрепарата Витаплан целесообразным представляется включение в его препаративную форму соединений, проявляющих свойства индукторов болезнеустойчивости, которые повышают неспецифический иммунитет растений к биогенным стрессам. Природный полисахарид хитозан — наиболее подходящий кандидат в качестве такого индуктора болезнеустойчивости.

На основании представления о том, что биологическая активность природных полисахаридов определяется их способностью индуцировать биохимические пути, приводящие к активации реакций защиты растений и формированию у них устойчивости к грибным, бактериальным и вирусным болезням можно предположить, что хитозан и его производные будут включать (отдельно или в комбинации с бактериальными клетками) системную устойчивость к фитопатогенам. Это нашло подтверждение в ряде работ, в которых было установлено, что добавление хитозана к микробам-антагонистам повышало эффективность биоагентов в защите овощных культур и клубники от мучнистой росы [12].

Хитозан и препараты на его основе широко используются в защите растений от болезней в качестве индукторов неспецифической устойчивости [1, 2]. Отдельного внимания заслуживают соединения, которыми проводится модификация хитозана, таких, как салициловая кислота, представляющая собой классический индуктор устойчивости растений к болезням, играющий центральную роль в защите растений от биотрофных патогенов [13]. Высокая индуцирующая активность салицилата хитозана по отношению к бурой ржавчине и темно-бурой пятнистости пшеницы была установлена ранее [14].

Цель работы — изучение возможности повышения эффективности биопрепарата Витаплан против темно-бурой пятнистости пшеницы путем включения в его состав салицилата хитозана как индуктора болезнеустойчивости.

## МЕТОДИКА

Работу проводили с использованием яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29. Для заражения использовали гриб *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechs. Ex Dastur (конидиальная стадия *Bipolaris sorokiniana* Sacc. In Sorok., Shoem.), вызывающий одну из наиболее вредоносных болезней пшеницы — темно-бурую листовую пятнистость, из “Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей” Центра коллективного пользования научным оборудованием “Инновационные технологии защиты растений” ВИЗР.

В экспериментах использовали штаммы-антагонисты *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D и фитопатогенные микроорганизмы из Государственной коллекции микроорганизмов ВИЗР. Культивирование штаммов проводили в течение 72 ч на питательной среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт 30, меласса 15, рН — 7.2, в колбах объемом 750 мл с 100 мл среды на лабораторной качалке при 28°C и 220 об./мин.

Биопрепарат Витаплан СП (смачивающийся порошок), разработанный в ВИЗР, и включенный в “Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории РФ”, предназначен для защиты основных сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней. Витаплан СП выпускается ЗАО “Агробиотехнология” ООО УК “АБТ-групп”. В настоящей работе использовали Витаплан в виде культуральной жидкости (КЖ), полученной при глубинном культивировании штаммов-продуцентов препарата *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D, что позволило оптимизировать его состав путем включения индукторов болезнеустойчивости.

Схема опыта предусматривала следующие варианты: контроль (обработка водой); Витаплан КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D в соотношении 1 : 1 (титр жизнеспособных клеток  $10^{10}$  КОЕ/мл); Витаплан + 0.05% салицилата хитозана (СХ); Витаплан + 0.1% СХ; Витаплан + 0.2% СХ; Витаплан + 0.5% СХ; композиция Витаплан + 0.1% СХ (КЖ препарата разводили дистиллированной водой в 10 раз (титр  $10^9$  КОЕ/мл) и добавляли СХ до концентрации 0.1%; салицилат хитозана (СХ) — 0.1%.

Для получения 0.1%-ного СХ использовали хитозан с мМ 60 кДа, полученный методом окислительной деструкции [15] из хитозана с молекулярной массой 150 кДа и степенью деацетилирования 85% (“Биопрогресс”, Россия). На его основе получали салицилат хитозана, содержащий ионно-связанные фрагменты салициловой кислоты, составляющие 25%, путем добавления СК до достижения концентрации раствора 0.1% по хитозану. Ионную природу связи (образование соли) между хитозаном и СК в производных (Хитозан + СК) подтверждали ИК-спектрами, полученными на спектрометре Spectrum VX (“Perkin Elmer”, США) по наличию характеристических полос  $1552.92$  и  $1386.12$   $\text{см}^{-1}$  карбоксильной группы  $-\text{COO}^-$ , а также широкой полосы в области  $3100-2600$   $\text{см}^{-1}$ , отражающей валентные колебания функциональных групп  $-\text{NH}_3^+$  и  $\text{OH}$  [16].

Титр жизнеспособных клеток в препарате определяли стандартным методом десятикратных серийных разведений с высевом на сухой питатель-

ный агар (СПА) для культивирования бактерий (АО “НПО “Микроген”, Россия) и последующим подсчетом числа выросших колоний. Оценку антибактериальной активности образцов по отношению к возбудителю бактериального рака томатов *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Smith) Davis et al. (штамм 101) и антигрибной активности по отношению к фитопатогенным микромицетам (*Alternaria solani* Sorauer, *Fusarium solani* (Mart.) Appel et al., *F. culmorum* Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. redolens* W.L. Gordon, *F. sporotrichoides* Sherb., *Sphaeropsis malorum* Peck., *Rhizactonia solani* J.G. Kühn, *Botrytis cinerea* Pers., *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechs. Ex Dastur, *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst.) проводили методом бумажных дисков по диаметру зоны лизиса тест-культур фитопатогенов на агаризованной питательной среде. Для этого поверхность агара Чапека в чашках Петри сплошным газоном засеивали суспензией фитопатогена с титром  $10^5$  КОЕ/мл, а затем на поверхность агара помещали стерильные бумажные фильтры диаметром 8 мм, на которые пипеткой наносили суспензию лабораторного образца препарата определенной концентрации. Выращивание тест-культур проводили в термостате при 22–25°C. Зоны лизиса измеряли на 5 сут.

Изучение прямого фунгистатического действия исследуемых образцов проводили *in vitro* методом агаровых блоков. В стерильные чашки Петри разливали охлажденную до 40°C агаризованную среду Чапека. После застывания на поверхность среды равномерно наносили суспензии испытуемых образцов препаратов (0.2 мл), а затем помещали блоки 10-суточных культур возбудителя гельминтоспориозной корневой гнили зерновых культур *C. sativus* диаметром 6 мм, вырезанные стерильным сверлом из мицелиальных газонов грибов, выращенных на агаре Чапека в течение 8–10 сут. В качестве контроля служили чашки с агаризованной средой Чапека с блоками тест-культуры без испытуемых образцов препаратов. Чашки инкубировали в темноте при 25°C. Диаметры колоний гриба измеряли на 5 и 7 сут. культивирования, после чего оценивали фунгистатическое действие испытуемых образцов по формуле Эббота [17].

Опыты по оценке иммуномодулирующей активности образцов препаратов проводили методом отделенных листьев [18]. За 24 ч до инокуляции патогеном 7-дневные проростки пшеницы восприимчивого к болезням сорта Саратовская 29 опрыскивали суспензиями препаратов в разведении 1 : 10. Заражение листьев пшеницы проводили суспензией спор ( $4 \times 10^3$ ;  $2 \times 10^4$  спор/мл) гембиотрофа *C. sativus*. Степень пораженности листьев пшеницы оценивали на 4 сут, признаки пораженности листьев пшеницы в виде бурых пятен при заражении *C. sativus* в контроле принима-

ли за 100%. Иммуномодулирующую активность исследуемых вариантов препаратов оценивали в процентах, как степень пораженности листьев растений патогеном по отношению к контролю.

Влияние различных препаратов Витаплана на прорастание конидий *C. sativum* проводили в капле (200 мкл). Раствор образца (0.1 мл) наносили на предметное стекло, добавляли 0.1 мл спор *C. sativus* и выдерживали в темноте при 22°C во влажной камере в течение 24 ч. Прорастание конидий оценивали микроскопированием, просматривая не менее 100–200 конидий в варианте и в контроле (в воде). Частоту прорастания выражали в процентах от общего числа спор, просмотренных в контроле и опыте.

Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики на основе стандартных ошибок средних  $\pm$ SEM, 95%-доверительных интервалов, наименьшей существенной разности НСР при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рассмотрены два пути использования салицилата хитозана для повышения биологической эффективности препарата Витаплан. Первый путь – это включение СХ в концентрации 0.05, 0.1, 0.2 и 0.5% в состав среды при глубинном культивировании штаммов *B. subtilis* (получении препарата Витаплан), другой – создание композиции путем включения СХ в концентрации 0.1% в состав конечной препаративной формы Витаплана.

На первом этапе исследований оценивали влияние различных концентраций СХ на жизнеспособность и антагонистическую активность штаммов, составляющих основу препарата Витаплан. На основании полученных данных выявили оптимальную концентрацию СХ в среде для глубинного культивирования, существенно повышающую антагонистическую активность штаммов *B. subtilis* (табл. 1).

Установлено, что включение СХ в среду для культивирования в концентрации 0.05 и 0.1% положительно повлияло на плотность бактериальных клеток и коррелировало с увеличением антагонистической активности штаммов Витаплана по отношению к тест-культурам (табл. 1).

Введение 0.2 и 0.5% СХ в питательную среду на порядок уменьшало титр жизнеспособных клеток штаммов, что закономерно приводило к снижению антагонистической активности КЖ по отношению к некоторым видам фитопатогенных микроорганизмов, таких, как *C. sativus*, *F. solani*, *C. lagenarium* и др.

Наибольшую антагонистическую активность по отношению к большинству тест-культур показали: Витаплан + 0.05% и Витаплан + 0.1% СХ.

**Таблица 1.** Влияние внесения СХ в состав питательной среды при получении препарата Витаплан на титр клеток и антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микроорганизмов

Тест-объект	КЖ (контроль)	Витаплан + СХ, %			
		0.05	0.1	0.2	0.5
Титр, КОЕ/мл	$1.3 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^{10}$
Диаметр зоны отсутствия роста, мм					
<i>Alternaria solani</i>	23.5 ± 1.6	30.8 ± 1.1	36.3 ± 1.2	22.8 ± 1.8	16.3 ± 0.4
<i>Fusarium solani</i>	14.8 ± 1.2	30.5 ± 1.3	27.0 ± 1.0	14.5 ± 0.8	17.7 ± 0.8
<i>F. culmorum</i>	16.8 ± 1.0	24.2 ± 1.2	25.2 ± 1.3	25.0 ± 1.2	15.5 ± 0.6
<i>F. graminearum</i>	18.5 ± 1.4	26.8 ± 1.1	26.2 ± 1.2	16.7 ± 0.7	18.5 ± 0.8
<i>F. redolens</i>	18.5 ± 1.2	29.5 ± 1.3	22.7 ± 1.4	19.5 ± 0.9	14.3 ± 0.6
<i>F. sporotrichoides</i>	15.3 ± 0.5	36.8 ± 1.4	21.7 ± 1.6	23.8 ± 0.8	13.5 ± 0.8
<i>Sphaeropsis malorum</i>	22.7 ± 1.2	27.2 ± 1.1	21.2 ± 1.2	17.2 ± 0.6	14.5 ± 1.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	24.2 ± 1.3	23.2 ± 1.2	22.3 ± 1.3	20.7 ± 1.0	12.0 ± 1.2
<i>Botrytis cinerea</i>	31.3 ± 1.2	41.2 ± 1.5	41.7 ± 2.0	35.8 ± 1.6	13.3 ± 0.5
<i>Cochliobolus sativus</i>	41.0 ± 1.8	47.2 ± 1.3	45.5 ± 2.2	17.5 ± 0.5	17.7 ± 0.8
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	35.0 ± 1.3	35.2 ± 1.5	31.2 ± 1.2	22.5 ± 0.7	16.5 ± 0.6
<i>Clavibacter michiganensis</i> 101	14.8 ± 1.0	17.2 ± 0.4	17.3 ± 0.6	13.3 ± 0.5	12.8 ± 0.4
НСП <sub>0.05</sub>	3.0	2.2	2.1	2.5	1.8

**Таблица 2.** Влияние СХ на фунгистатическую активность препарата Витаплан по отношению к *C. sativus*

Вариант	Ингибирование роста мицелия <i>C. sativus</i> , %		Прорастание конидий <i>C. sativus</i> , % к контролю
	5 сут	7 сут	
Контроль (вода)	—	—	85.2
Витаплан	63.3	73.3	47.6
Витаплан+0.05% СХ	62.2	71.7	55.9
Витаплан +0.1% СХ	61.1	70.8	50.0
Витаплан+0.2% СХ	57.8	62.5	65.8
Витаплан +0.5% СХ	46.7	59.2	84.1
Витаплан +0.1% СХ*	52.2	57.5	9.0
0.1% СХ	40.9	38.6	3.3
НСП <sub>0.5</sub>	3.2	3.8	4.3

\* СХ вносили в полученную культуральную жидкость (КЖ).

На следующем этапе была проведена оценка способности препаратов Витаплан + СХ ингибировать рост гриба и прорастание конидий патогена, а также повышать устойчивость пшеницы к возбудителю темно-бурой пятнистости.

В соответствии с регламентами применения биопрепаратов в сельском хозяйстве, сравнительную оценку биологической эффективности Витаплана и его вариантов с СХ проводили, используя титр  $10^9$  КОЕ/мл. Результаты оценки влияния различных препаратов Витаплана + СХ на линейный рост и на прорастание конидий *C. sativus* *in vitro* представлены в табл. 2.

Установлена высокая фунгистатическая активность Витаплана, которая составляла 73.3% на 7 сут опыта. При добавлении в среду для глубинного культивирования 0.05 и 0.1% СХ высокая антигрибная активность сохранялась (71.7 и 70.8%). Увеличение концентрации СХ до 0.2 и 0.5% снизило фунгистатическую активность Витаплана до 62.5 и 59.2% соответственно, что могло быть обусловлено уменьшением плотности суспензии клеток бактерий в биопрепарате (табл. 1).

Композиция Витаплан + 0.1% СХ, полученная путем включения салицилата хитозана в готовую форму биопрепарата Витаплан, ингиби-

**Таблица 3.** Влияние Витаплана + СХ на устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, (метод отделенных листьев, сорт Саратовская 29)

Варианты препаратов	Площадь поражения листьев пшеницы <i>C. sativus</i> , %	
Контроль	30	60
Витаплан	15	50
Витаплан + 0.05% СХ	10	40
Витаплан + 0.1% СХ	5	30
Витаплан + 0.2% СХ	30	60
Витаплан + 0.5% СХ	30	60
Витаплан + 0.1% СХ*	5	25
0.1% СХ	3	5
НСР <sub>0,5</sub> = 4.5		

\* СХ вносили в полученную КЖ.

ривала мицелиальный рост аскомицета до 57.5%. Снижение фунгистатической активности композиции по сравнению с исходным биопрепаратом Витаплан (73.3%) на 7 сут культивирования, во-видимому, связано с невысоким фунгистатическим эффектом самого СХ. Известно, что биоцидная активность хитозана обусловлена поликатионной природой полимера и способностью связываться с отрицательно заряженными поверхностными структурами клеток [19], что нарушает нормальное функционирование обменных процессов клетки с внешней средой и ингибирует рост мицелия гриба.

Согласно полученным данным, СХ как индуктор болезнеустойчивости обладал небольшой фунгистатической активностью, сдерживая рост мицелия *C. sativus* лишь на 40.9% на 5 сут совместного культивирования и на 38.6% – на 7 сут (табл. 2).

Известно, что споры грибов – главный источник инфицирования растений. Скорость прорастания спор имеет большое значение для возникновения заболевания, поэтому факторы, ускоряющие или замедляющие ее, оказывают существенное влияние на процесс заражения растений.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что Витаплан без СХ только вдвое ингибировал прорастание конидий *C. sativus* (47.6%) по сравнению с контролем (85.2%). Препарат Витаплан с СХ в концентрации 0.05 и 0.1% в стандартной среде для глубинного культивирования также ингибировали прорастание конидий аскомицета до 55.9 и 50.0% к контролю соответственно. Увеличение концентрации СХ до 0.2 и 0.5% снижало способность биопрепарата подавлять прорастание конидий *C. sativus*.

Установлен высокий ингибирующий эффект композиции Витаплан + 0.1% СХ на прорастание

конидий *C. sativus*. Если в контроле через 24 ч проросло 85.2%, то в опыте проросших конидий обнаружено только 9.0% (табл. 2). По-видимому, такая высокая ингибирующая активность композиции обусловлена включением в ее состав 0.1% СХ, который активно сдерживал прорастание конидий микромицета – количество проросших спор в данном варианте через сутки составило 3%.

Анализ результатов изучения индуцирующей активности Витаплана показал, что их эффективность зависит от интенсивности поражения растений пшеницы возбудителем темно-бурой пятнистости *C. sativus* (табл. 3).

В контрольных растениях, инфицированных *C. sativus*, интенсивность заражения составляла 30% и 60% от площади листа при разных инфекционных нагрузках. Предварительная обработка Витапланом КЖ с последующим заражением возбудителем темно-бурой пятнистости снижала площадь поражения листьев на 10–15% в зависимости от уровня развития болезни в контроле. Опрыскивание растений пшеницы препаратом Витаплан + 0.05% СХ сокращало пораженность листьев в 1.5–3 раза, а Витаплан + 0.1% СХ – в 2–6 раз.

Отсутствие индуцирующей активности у препаративных форм Витаплан + 0.2% СХ и Витаплан + 0.5% СХ, вероятно, связано с более низким ингибированием прорастания конидий *C. sativus* и слабым фунгистатическим эффектом (табл. 2) по сравнению с другими вариантами (табл. 3).

Обработка растений пшеницы композицией Витаплан + 0.1% СХ повышало устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, что выражалось в снижении площади поражения листьев возбудителем в 2–6 раз по отношению к контролю. Поскольку 0.1% СХ обладал высокой индуцирующей активностью, то при добавлении к Витаплану наблюдалось усиление иммуномодулирующей активности биопрепарата в 2–3 раза (табл. 3).

Индуцирующая активность препаратов Витаплан, содержащих в своем составе СХ, положительно коррелировала со степенью ингибирования прорастания конидий *C. sativus*. Чем сильнее подавлялось прорастание спор патогена, тем выше была индуцирующая активность образца (табл. 2, 3).

Таким образом, на примере патосистемы пшеница – *C. sativus* изучена биологическая активность новых форм биопрепарата Витаплан в отношении темно-бурой пятнистости пшеницы. Из всех вариантов опыта наибольшую эффективность показали два препарата, полученные разными способами:

- Витаплан + 0.1% СХ – добавление 0.1% салицилата хитозана в среду для глубинного культивирования штаммов–продуцентов;
- Композиция: Витаплан + 0.1% СХ – добавление 0.1% салицилата хитозана в КЖ после получения препарата.

Биологическая эффективность биопрепарата Витаплан КЖ обусловлена двумя механизмами, лежащими в основе взаимоотношений в патосистеме пшеница – *Cochliobolus sativus*, это прямое биоцидное воздействие штаммов *Bacillus* на микромицеты, а также усиления системной устойчивости растений. Прямое биоцидное действие *B. subtilis* связывалось, по-видимому, с синтезом ими различных метаболитов с антибиотической активностью – антибиотиков, биосурфактантов, сидерофоров и др. [20–22]. Помимо прямого антагонистического действия на клетки возбудителя, бациллы способны также повышать устойчивость растений синтезируя элиситоры, благодаря которым происходит активация системной индуцированной устойчивости и системной приобретенной устойчивости [23, 24]. Элиситорами, запускающими защитные реакции у растений, могут быть белки, липопептиды, полисахариды и др. соединения, ассоциированные с клеточной стенкой бактерии *B. subtilis* [4, 25, 26], а также антибиотики и биосурфактанты [6, 8, 23, 27–29].

Согласно исследованиям Шенина с соавт. [30] и Новиковой с соавт. [9] высокая биологическая эффективность биопрепарата Витаплан обусловлена синтезом штаммами *B. subtilis* метаболитных комплексов сложного состава, включающего пептидные и полиеновые антибиотики. Установленная в работе высокая фунгистатическая активность Витаплана по отношению к *C. sativus* (73.3%, табл. 2), по-видимому, определяется синтезом штаммами *B. subtilis* антибиотических веществ, подавляющих или замедляющих рост фитопатогена.

Индущирующая активность исходного биопрепарата Витаплан проявилась в понижении пораженности листьев пшеницы *C. sativus* на 10–15% в зависимости от инфекционной нагрузки (табл. 3). Полученные результаты согласовывались с имеющимися в литературе данными. Так, показано, что снижение развития болезни в результате опрыскивания листьев ячменя фильтратом КЖ штамма *Bacillus amyloliquefaciens* перед инокуляцией *C. sativus*, обусловлено запуском индуцированной устойчивости [31].

Биопрепарат Витаплан представляет собой культуральную жидкость высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D), полученных методом глубокого культивирования. В состав культуральной жидкости входят споры штаммов, остатки питательной среды, а также метаболиты, выделенные в среду в процессе ферментации [9, 30]. Следует отметить, что при глубокой ферментации штаммов, входящих в препарат Витаплан, в среде с СХ происходило расщепление и утилизация его как субстрата, а также, вероятно, выход в среду салициловой кислоты, связанной лабильной ионной

связью с хитозаном, вследствие диссоциации соли.

Таким образом, получены варианты жидкого препарата, содержащие комплекс различных метаболитов с антибиотической активностью, с гормональными и сигнальными функциями (такие, как ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая, салициловая, жасмоновая кислоты), а также набор олигомеров хитозана, обладающих элиситорной активностью.

Более высокая способность препарата Витаплан + 0.1% СХ индуцировать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости по сравнению с исходной может быть обусловлена наличием олигомеров хитозана, образующихся при гидролизе СХ хитиназами бактерии [32], которые, как известно, являются эффективными элиситорами индуцированной устойчивости растений [33, 34].

Повышенная биологическая активность композиции препарата Витаплан + 0.1% СХ, по-видимому, определяется совмещением фунгицидной активности препарата и индукции защитных реакций растения СХ.

Согласно работе [35] и другим работам применение 0.1%-ного СХ может эффективно индуцировать реакции защиты от патогенов, формируя устойчивость к болезням [13]. Однако СХ может обладать и прямым действием на патоген, блокируя прорастание спор, поскольку хитозан является пленкообразующим полимером. Нанесенный на листья растений, он может задерживать также прорастание и развитие спор [36]. Это подтверждается результатами по ингибированию прорастания конидий *C. sativus* 0.1%-ным раствором СХ (табл. 2) и согласуется с проведенными ранее гистологическими исследованиями, которые показали, что на поверхности плодов цитрусовых, обработанных хитозаном, наблюдалось ограничение роста патогена и нарушение структуры его гиф [37].

На основании результатов, полученных в настоящей работе, можно утверждать, что после обработки растений пшеницы новыми препаратами Витаплан, содержащими СХ или его олигомеры, запускаются механизмы защитных реакций, которые выражаются в формировании химических и физических барьеров против атаки патогена. Кроме того, у обработанных растений пшеницы внедрение гриба в эпидермальный слой сдерживается в результате прямого ингибирования прорастания конидий фунгицидными компонентами метаболитных комплексов штаммов *Bacillus*. Композиция Витаплан + 0.1% СХ, которую получили смешиванием КЖ штаммов *Bacillus subtilis* после окончания ферментации с СХ (0.1%), обладала более высокой биологической активностью по сравнению с другими препаратами. Это связано с тем, что пленкообразующий полимер хитозан при нанесении на листья растений задержи-

вал прорастание конидий *C. sativus* и проникновение патогена в ткани (табл. 2), что проявлялось в снижении степени пораженности растений. Таким образом, биологическая эффективность препарата Витаплана и препаратов с СХ обусловлена несколькими способами воздействия, каждый из которых потенциально может тормозить развитие болезней, что существенно повышает их защитный эффект.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности создания нового поколения экологически безопасных средств защиты растений на основе сочетания активных штаммов микроорганизмов—антагонистов и хитозанов для повышения биологической эффективности и расширения спектра действия препаративных форм, предназначенных для защиты растений от болезней.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Немцев С.В., Тихонов В.Е. Хитин и хитозан: природа, получение и применение. Щелково: Изд-во Российского Хитинового Общества, 2010. 292 с.
2. Badawy M.E.I., Rabea E.I. // International Journal of Carbohydrate Chemistry. 2011. V. 2011. Review Article. 29 p. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
3. Тютерев С.Л. Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб: ВИЗР, 2014. 212 с.
4. De Vleeschauwer D., Höfte M. // Adv. Bot. Res. 2009. № 51. P. 223–281. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51006-3)
5. Максимов И.В., Абизильдина Р.Р., Пусенкова Л.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 373–385.
6. Максимов И.В., Веселова С.В., Нужная Т.В., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М. // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 6. С. 763–775. <https://doi.org/10.7868/s0015330315060111>
7. Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R., Kolter R. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 11. № 3. P. 157–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960PMID:23353768>
8. Pieterse C., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S., Bakker P. // Annu. Rev. Phytopathol. 2014. № 52. P. 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
9. Novikova I.I., Shenin Y.D. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 9. P. 817–826. <https://doi.org/10.1134/S0003683811090031>
10. Новикова И.И., Бойкова И.В., Павлюшин В.А., Зейрук В.Н., Васильева С.В., Азизбекян Р.Р., Кузнецова Н.И. // Вестник защиты растений. 2013. № 4. С. 12–21.
11. Павлюшин В.А., Новикова И.И., Бойкова И.В. // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 3. С. 421–438. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421rus>
12. Abdel-Kader M.M., El-Mougy N.S., Aly M.D., Lashin S.M. // Int. J. Agric. Forestry. 2012. V. 2. № 2. P. 8–48. <https://doi.org/10.5923/j.ijaf.20120202.07>
13. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
14. Попова Э.В., Коваленко Н.М., Сокорнова С.В., Тютерев С.Л., Домнина Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 540–545. <https://doi.org/10.1134/S055510991805015X>
15. Muzzarelli R.A.A. Chitin. N.Y.: Pergamon Press, Oxford, 1977. 326 p.
16. Федосеева Е.Н., Федосеев В.Б. // Высокомол. соед., Серия А. 2011. Т. 53. № 11. С. 1900–1907.
17. Oh J.-W., Chun SeC., Chandrasekaran M. // Agronomy. 2019. V. 9. № 2. P. 21–33. <https://doi.org/10.3390/agronomy9010021>
18. Kumar J., Hüekelhoven R., Beckhove U., Nagarajan S., Kogel K.-H. // Phytopathology. 2001. V. 91. № 2. P. 127–133. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.127>
19. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 5. С. 91–97.
20. Cao Y., Xu Z., Ling N., Yuan Y., Yang X., Chen L., Shen B., Shen Q. // J. Am. Soc. Sci. Hortic. 2012. № 135. P. 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.12.002>
21. Rezuanel I., Jeong Y-T., Lee Y.S., Song C.H. // Mycobiology. 2012. V. 40. № 1. P. 59–66. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.059>
22. Wang T., Liang Y., Wu M., Chen Z., Lin J., Yang L. // Chin. J. Chem. Eng. 2015. V. 23. № 4. P. 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>
23. Ongena M., Jordan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J-L., Thonart P. // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. № 4. P. 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
24. Ahn I-P., Park K., Kim C-H. // Mol. Cells. 2002. V. 13. № 2. P. 302–308.
25. Van der Ent S., Van Wees S., Pieterse C. // Phytochemistry. 2009. V. 70. № 13–14. P. 1581–1588. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.009>
26. Van Loon L.C. // Eur. J. Plant Pathol. 2007. V. 119. № 3. P. 243–254. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>
27. Ongena M, Henry G, Thonart P. Recent Developments in Management of Plant Diseases (Plant Pathology in the 21st Century). / Ed. U. Gisi, L. Chet, M.L. Guillino, Dordrecht, Heidelberg, London, N.Y.: Springer Science + Business Media B, 2010. V. 1. P. 59–69. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9_5)
28. Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J. // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. № 7. P. 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
29. Veselova S.V., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. In: Jasmonic Acid: Biosynthesis, Functions and Role in Plant Development / Ed. Morrison L., N.Y.: Nova Science, 2015. P. 33–66.

30. Шенин Ю.Д., Новикова И.И., Кругликова Л.Ф., Калько Г.В. // Антибиотики и химиотерапия. 1995. Т. 40. № 5. С. 3–7.
31. Kriuchkova L.O. // Biologija. 2017. V. 63. № 3. P. 289–295.
32. San-Lang W., Tzu-Yin L., Yue-Horng Y., Hui-Fen L., Yu-Jen C. // Carbohydr Res. 2006. V. 341. № 15. P. 2507–2515.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.027>
33. Yin H., Li Y., Zhang H.Y., Wang W.X., Lu H., Grevsen K., Zhao X., Du Y. // Int. J. Plant Sci. 2013. V. 174. № 4. P. 722–732.  
<https://doi.org/10.1086/669721>
34. Deepmala K., Hemantaranjan A., Bharti S., Nishant Bhanu A. // Advances in Plants & Agriculture Research. 2014. V. 1. № 1. P. 23–30.  
<https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>
35. Колесников Л.Е., Попова Э.В., Новикова И.И., Прияткин Н.С., Архипов М.В., Колесникова Ю.Р. и др. // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 1024–1040.  
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.1024rus>
36. Луньков А.П., Ильина А.В., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 444–454.  
<https://doi.org/10.1134/S0555109918050124>
37. Benhamou N. // Phytopathology. 2004. V. 94. № 7. P. 693–705.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.693>

## Using Chitosan Salicylate for Increasing Vitaplan Biological Efficiency

I. I. Novikova<sup>a,\*</sup>, E. V. Popova<sup>a</sup>, I. L. Krasnobaeva<sup>a</sup>, and N. M. Kovalenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, 196608 Russia

\*e-mail: [irina\\_novikova@inbox.ru](mailto:irina_novikova@inbox.ru)

The biological effectiveness of a biological product containing chitosan salicylate in the medium for cultivation of strains producing *Bacillus subtilis* VKM B-2604D and VKM B-2605D or in a ready-made preparative form in protecting wheat from dark brown spot, the causative agent *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kuribus), was studied. The inclusion of 0.1% chitosan salicylate in the Vitaplan, CF, increases the inducing effect of the biological product by 1.5–2 times. The increased biological activity of the new formulations of Vitaplan, CF is apparently determined by the combination of the fungicidal activity of the biological product and the induction by chitosan salicylate and chitooligosaccharides plant defense reactions.

**Keywords:** biological product Vitaplan, CF preparative forms, fungistatic activity, antagonistic effect, chitosan salicylate, induced resistance, wheat, dark brown spot

УДК 638.12

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ПЧЕЛ НА ПРИМЕРЕ АМИТРАЗА

© 2022 г. А. И. Албулов<sup>1</sup>, М. А. Фролова<sup>1</sup> \*, Э. И. Зелинская<sup>1</sup>, А. К. Елисеев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Московская область, Щелковский район, пос. Биокомбината, 141142 Россия

\*e-mail: vnitbp@mail.ru

Поступила в редакцию 23.08.2021 г.

После доработки 28.12.2021 г.

Принята к публикации 10.01.2022 г.

Изучено влияние хитозана на выживаемость пчел, обработанных химическим акарицидом амитразом 50%-ной летальной дозой (ЛД<sub>50</sub>), соответствующей 10 мкг на пчелу. Установлено, что добавление в течение первых 8 дней до обработки амитразом сукцината хитозана и низкомолекулярного хитозана в соотношении 1 : 5 в дозе 0.144 г/л 60%-ного сахарного сиропа из расчета 1 л сахарного сиропа на 10000 пчел (II опытная группа) привело к повышению выживаемости пчел к концу срок наблюдения (30 сут) в 1.45 раза по сравнению с контрольной группой, получавшей только сахарный сироп и в 4.45 раза по сравнению с опытной группой I, получавшей сахарный сироп и на девятые сутки обработаны амитразом. При этом продолжительность жизни пчел увеличивалась как минимум на 5 дней по сравнению с I опытной группой при средней продолжительности жизни пчел каждой генерации в летний период 35–40 дней.

*Ключевые слова:* хитозан, химический акарицид амитраз, варроатоз, медоносная пчела

**DOI:** 10.31857/S0555109922030035

В настоящее время большой проблемой для пчеловодства является варроатоз и постоянная борьба с ним с использованием химических препаратов. Однако несмотря на то, что обработка пчел химическими акарицидами эффективна в борьбе с варроатозом, она приводит к побочному токсичному воздействию на пчел. Главным отрицательным воздействием химических акарицидов является ослабление иммунной системы пчелы, в результате чего возрастает восприимчивость к инфекциям, а также снижаются хозяйственно полезные признаки пчелиной семьи [1–4]. Препараты, разработанные на основе природных компонентов, позволяют избежать многих побочных эффектов. Механизмы их действия также существенно отличаются. Прежде всего, они основаны на активации естественных защитных реакций организма. В связи с этим возникает необходимость применения средств, которые способны инактивировать или снижать отрицательное воздействие химических препаратов, которые могут накапливаться в организме пчел, или искать другие альтернативные препараты, разработанные на основе природных компонентов. Это позволит избежать многих побочных эффектов, и, несомненно, поможет сохранить естественные защитные реакции организма медоносных пчел [5, 6].

В настоящее время в ветеринарии все больше применяются биостимуляторы на основе хитозана и его производных [7, 8]. Хитозан и его производные обладают множеством свойств, которые позволяют применять их в пчеловодстве: это природное происхождение и отсутствие токсичности, иммуномодулирующие свойства, антимикробная активность, способность повышать устойчивость и выводить из организма пчел тяжелые металлы и токсины. Хитозан – производное хитина, который является естественным компонентом скелета пчел. Под действием ферментов хитиназы и хитобиазы хитин и хитозан расщепляются до N-ацетил-D-глюкозамина. Именно благодаря этому хитозан полностью разрушается и не загрязняет окружающую среду, так как биodeградирует до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

Цель работы – изучение влияния хитозана на выживаемость пчел, обработанных химическим акарицидом амитразом.

### МЕТОДИКА

Работу проводили в лабораторных условиях на осенней генерации пчел, содержащихся в энтомологических садках. Было сформировано три группы пчел: контрольная, получавшая в течение всего эксперимента 60%-ный сахарный си-

**Таблица 1.** Влияние хитозана на выживаемость пчел, обработанных амитразом

№ группы	Количество пчел в начале опыта, шт	Количество пчел по дням опыта (шт.), выжило/погибло								Выживаемость, %
		1	8	9	10	15	16	18	30	
Контрольная	60	58/2	45/15	25/35	23/37	20/40	14/46	10/50	5/55	8.3
I опытная	73	70/3	58/15	43/30	13/60	10/63	6/67	4/69	2/71	2.7
II опытная	58	54/4	38/20	33/25	25/33	17/41	14/44	14/44	7/51	12.0

роп; опытная I, получавшая в течение всего опыта 60%-ный сахарный сироп и на 9 сут обработанная 50%-ной (ЛД<sub>50</sub>) летальной дозой амитраза (C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>), равной 10 мкг на пчелу. Третья группа (опытная II) получала также как и две предыдущие в течение всего опытного периода 60%-ный сахарный сироп с добавлением в течение первых 8 сут, до обработки амитразом, сукцинат хитозана (“Биопрогресс”, Россия) и низкомолекулярный хитозан в соотношении 1 : 5 в концентрации 0.144 г/л 60%-ого сахарного сиропа (из расчета 1 л сахарного сиропа на 10000 пчел) и на 9 сут была обработана амитразом. Влияние испытуемых производных хитозана на жизнеспособность пчел оценивали по динамике их гибели в течение срока наблюдения (30 сут).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

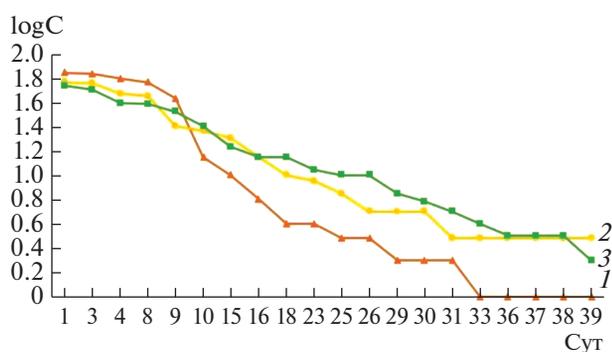
Из результатов, представленных в табл. 1 видно, что через сутки после обработки пчел амитразом во II опытной группе, которой скармливали 60%-ный сахарный сироп с добавлением производных хитозана, гибель пчел составила 24.24%. В I опытной группе, которой скармливали только сахарный сироп, гибель пчел достигала 69.77%. На 30 сут опыта в контрольной группе выживаемость пчел составила 8.33%, в то время как в I и II опытных группах — 2.74 и 12.07% соответственно. Таким образом, скармливание пчелам сукцината хитозана и низкомолекулярного хитозана в соотношении 1 : 5 в общей дозе 0.144 г/л

60%-ого сахарного сиропа (из расчета 1 литр сахарного сиропа на 10000 пчел) в течение 8 сут до обработки 50%-ной летальной дозой амитраза (II опытная группа) привело к повышению выживаемости пчел к концу опытного периода в 1.45 раза по сравнению с контрольной группой и в 4.4 раза по сравнению с I опытной группой.

Из рис. 1 видно, что II опытная группа, которой скармливали производные хитозана и обрабатывали химическим акарицидом, имела значительно большие показатели по показателю выживаемости над I опытной группой, не получавшей хитозан и обработанной амитразом. Так же, выявлено во II опытной и контрольной группе увеличение продолжительности жизни как минимум на 5 дней по сравнению с I опытной группой, при средней продолжительности жизни пчел в садках около 30 сут. Такая продолжительность жизни объясняется тем, что условия содержания пчел в садках не являются для них благоприятными. Вместе с тем, зимующие пчелы живут 220—285 и даже 300 сут. Этот феномен связан прежде всего с физиологией пчелы. Для долгоживущих зимних особей характерны бездеятельность, отсутствие полетов за нектаром, прием пыльцы.

В научной литературе встречаются публикации, доказывающие, что хитозан оказывает иммуномодулирующее действие на медоносных пчел [9—11]. Показано, что сукцинат хитозана (солевая форма янтарной кислоты и хитозана), стимулирует иммунную систему организма и обладает адаптивным действием, активизирует гигиеническое поведение пчел. Низкомолекулярный хитозан имеет избыточный положительный заряд, что придает ему свойства высокоактивного анионита и позволяет хитозану связывать и прочно удерживать ионы различных тяжелых металлов, радиоактивных изотопов, токсичных элементов с последующим выведением их из организма пчелы.

Таким образом, установлено, что скармливание пчелам сукцината хитозана и низкомолекулярного хитозана в соотношении 1 : 5 в общей дозе 0.144 г на 1 литр 60%-ного сахарного сиропа из расчета 1 литр сахарного сиропа на 10000 пчел в течение 8 дней до обработки 50%-ного летальной дозой химического акарицида амитраза способствовало повышению выживаемости пчел к концу опытного периода в 4.4 раза.



**Рис. 1.** Влияние производных хитозана на выживаемость пчел (log числа особей, C), обработанных амитразом. 1 — I опытная группа, 2 — контрольная группа, 3 — II опытная группа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баньковский В.В., Еськов Е.К., Баньковский Д.А., Ярошевич Г.С. // Пчеловодство. 2009. № 1. С. 26–27.
2. Клочко Р.Т., Луганский С.Н. // Пчеловодство. 2011. № 2. С. 28–29.
3. Гиниятуллин М.Г., Шелехов Д.В. // Теоретические и прикладные аспекты современной науки. 2014. № 5. С. 179–181.
4. Ильясов Р.А., Шареева З.В. // Аграрная Россия. 2014. № 10. С. 21–22.
5. Маннапов А.П., Мишуковская Г.С., Циколенко С.П., Мамаев В.П. // Пчеловодство. 2004. № 7. С. 16–18.
6. Хамадиева А.Р., Кутлин Н.Г., Назмиев Б.К., Салтыкова Е.С. // Ученые записки казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2021. Т. 209. С. 325–330.
7. Хамадиева А.Р., Кутлин Н.Г., Назмиев Б.К., Салтыкова Е.С. // Вестник Оренбургского государственного университета. 2011. № 2(131). С. 445–446.
8. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Гатауллин А.Р., Каримова А.А., Николенко А.Г. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 1. С. 157–159.
9. Еськов Е.К., Ярошевич Г.С. // Пчеловодство. 2006. № 5. С. 15–16.
10. Салтыкова Е.С., Каримова А.А., Гатауллин А.Р., Гайфуллина Л.Р., Матниязов Р.Т., Фролова М.А., Албулов А.И., Николенко А.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. № 5. С. 545–549.
11. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Гатауллин А.Р., Каримова А.А., Николенко А.Г. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 1. С. 157–159.

## The Use of Chitosan for Reducing the Negative Impact of Chemicals on Bees on the Example of Amitraz

A. I. Albulov<sup>a</sup>, M. A. Frolova<sup>a</sup>, \*, E. I. Zelinskaya<sup>a</sup>, and A. K. Eliseev<sup>a</sup>

<sup>a</sup> All-Russian Scientific Research and Technological Institute of the Biological Industry, Moscow Reg., Schelkovsky District, settlement Biokombinat, 141142 Russia

\*e-mail: vnitbp@mail.ru

The effect of chitosan on the survival of bees treated with the chemical acaricide amitraz at a 50% lethal dose (LD50) of 10 µg per bee was studied. It was found that the addition of chitosan succinate and low molecular weight chitosan during the first 8 days before treatment with amitraz in a ratio of 1 : 5 at a dose of 0.144 g per 1 liter of 60% sugar syrup at the rate of 1 liter of sugar syrup per 10.000 bees (II experimental group) led to an increase in the survival of bees by the end of the observation period (30 days) by 1.45 times compared with the control group, which received only sugar syrup and 4.45 times compared with the experimental group I, which received sugar syrup and was treated with amitraz on the ninth day. At the same time, the life expectancy of bees increased by at least 5 days compared with the first experimental group, with an average life expectancy of bees of each generation in the summer period of 35–40 days.

*Keywords:* chitosan, chemical acaricide amitraz, varroaosis, honey